

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 487**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11746147 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2431466**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico monocatenario para controlar la expresión génica**

30 Prioridad:

**08.07.2010 JP 2010156122**

**03.08.2010 JP 2010174915**

**13.10.2010 JP 2010230808**

**13.10.2010 JP 2010230806**

**02.12.2010 JP 2010269824**

**02.12.2010 JP 2010269823**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.11.2015**

73 Titular/es:

**BONAC CORPORATION (100.0%)  
Fukuoka BIO Factory 4F 1488-4 Aikawa-machi  
Kurume-shi, Fukuoka 839-0861, JP**

72 Inventor/es:

**OHGI, TADAAKI;  
HAYASHI, HIROTAKE;  
SHIROHIZU, HISAO;  
HAMASAKI, TOMOHIRO;  
ITOH, AKIHIRO y  
SUZUKI, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 550 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Molécula de ácido nucleico monocatenario para controlar la expresión génica

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que inhibe la expresión génica, a una composición que contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario, y al uso de la molécula de ácido nucleico monocatenario.

10

**Antecedentes de la técnica**

Se conoce la interferencia del ARN (ARNi) como técnica para inhibir la expresión génica, por ejemplo (Fire et al, Nature, vol. 391, 806-811, 1998). La inhibición de la expresión génica se suele llevar a cabo mediante la interferencia del ARN administrando una molécula de un ARN bicatenario corto a una célula o similar, por ejemplo. La molécula de ARN bicatenario se denomina normalmente ARNip (ARN interferente pequeño). Se ha notificado que no solo la molécula del ARNip sino también una molécula de ARN circular que se vuelve parcialmente bicatenaria mediante hibridación intermolecular puede inhibir también la expresión génica (JP 2008-278784 A). Sin embargo, las moléculas de ARN utilizadas en estas técnicas para inducir la inhibición de la expresión génica tienen los siguientes problemas.

20

En primer lugar, para producir el ARNip, es necesario sintetizar una cadena de sentido directo y una cadena de sentido contrario por separado e hibridar estas cadenas al final del proceso. De esta manera, existe un problema de baja eficacia de fabricación. Además, cuando se administra el ARNip a una célula, es necesario administrar el ARNip a la célula a la vez que se reprime la disociación de los ARN monocatenarios, lo que requiere una laboriosa tarea de ajuste de las condiciones para manipular el ARNip. Por otra parte, la molécula de ARN circular tiene el problema de que su síntesis es difícil.

25

Yu et al, PNAS vol 99, nº 9, 6047-6052, 2002 notifica la interferencia del ARN mediante la expresión de ARN interferentes cortos y de ARN en horquilla en células de mamíferos. Paddison et al, Genes & Development vol 16, nº 8, 948-958, 2002 notifica que los ARN de horquilla corta (ARNhc) inducen un silenciamiento específico de secuencia en células de mamíferos: McAnuff et al, J. Pharmaceutical Sciences vol 96, nº 11.2922-2930, 2007 compara la potencia de la desactivación *in vivo* mediada por ARNip comparada con la de ARNhc *in vivo*.

30

El documento US 2002/0156261 A1 describe oligonucleótidos que pueden modificar o inhibir la expresión *in vivo* o *in vitro* de un gen diana donde el oligonucleótido tiene una secuencia de sentido contrario, al menos una estructura secundaria, y opcionalmente una secuencia de nucleótidos suplementaria localizada en uno y/o ambos extremos de la secuencia de sentido contrario y donde la estructura secundaria se desintegra tras la unión del oligonucleótido a un ácido nucleico diana.

35

El documento EP 1669450 A1 se refiere a los denominados oligonucleótidos "esenciales" para uso como medicamentos. Los oligonucleótidos esenciales son monocatenarios y comprenden una secuencia en el extremo 5', y una secuencia intermedia y una secuencia en el extremo 3'. La secuencia en el extremo 5' tiene una complementariedad inversa con la secuencia intermedia. La secuencia en el extremo 3' tiene una complementariedad inversa con la secuencia intermedia. La secuencia intermedia tiene bucles de 3 a 10 nucleótidos en ambos extremos. Cada bucle no forma un enlace complementario intramolecularmente.

40

El documento WO 2009/076321 describe moléculas de ácido nucleico que incluyen una región complementaria de un gen diana y una o más regiones autocomplementarias. Dichos ácidos nucleicos se usan para modular la expresión génica y tratar una variedad de enfermedades e inflexiones.

45

**Breve resumen de la invención**

Recordando lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar una molécula de ARN novedosa que pueda inhibir la expresión génica y pueda producirse fácil y eficazmente.

50

Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una molécula de ARN monocatenario que comprende solo una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, donde:

55

- la molécula comprende, en secuencia, desde un lado 5' a un lado 3': una región en el lado 5' (Xc); una región interna (Z) que comprende la secuencia inhibidora de la expresión y que está compuesta por una región interna en el lado 5' (X) y una región interna en el lado 3' (Y) que están unidas entre sí; y una región en el lado 3' (Yc);
- la región del lado 5' (Xc) es complementaria de la región interna del lado 5' (X);
- la región del lado 3' (Yc) es complementaria de la región interna del lado 3' (Y);
- 60 - la región del lado 5' (Xc) y la región interna del lado 5' (X) están unidas entre sí mediante una región enlazadora (Lx) que no se autohibrida consigo misma;
- la región del lado 3' (Yc) y la región interna del lado 3' (Y) están unidas entre sí a una región enlazadora (Ly) que no se autohibrida consigo misma;
- el número de bases (Z) de la región interna (Z), el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X), el número de bases (Y) de la región interna del lado 3' (Y), el número de bases (Xc) de la región del lado 5' (Xc) y el número de bases (Yc) en la región del lado 3' (Yc) satisfacen las siguientes condiciones:

65

$$Z = X + Y;$$

$$Z > Xc + Yc;$$

5  $Z = 19 \text{ a } 30;$

$$Xc = 1 \text{ a } 7 \text{ o } Yc = 1 \text{ a } 9;$$

y

10

$$Z - (Xc + Yc) = 0 \text{ o } 1 \text{ a } 10;$$

y

- el número bases en cada una de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) es de 3 a 50.

15 La presente invención proporciona también una composición para inhibir la expresión de un gen diana. La composición contiene la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la presente invención.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que contiene la molécula de ARN de acuerdo con la presente invención.

20

La presente invención proporciona también:

- un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, donde la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la presente invención se usa y administra a una célula, un tejido o un órgano; y
- 25 - un método *in vitro* para inducir la interferencia del ARN que inhibe la expresión de un gen diana, comprendiendo el método utilizar la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la presente invención.

La presente invención proporciona también una molécula de ARN para su uso en un método para tratar una enfermedad, donde:

30

- la molécula de ARN es la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la presente invención, y
- la molécula de ARN monocatenario incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que produce la enfermedad.

35 Utilizando la molécula de ARN monocatenario de la presente invención, es posible inhibir la expresión génica. Además, puesto que la molécula de ARN monocatenaria no es circular, se puede sintetizar fácilmente. Asimismo, puesto que se trata de una sola cadena, no es necesaria una etapa de hibridación como la que se requiere en la producción de una cadena doble, por lo tanto se puede producir eficazmente.

40 Son los inventores de la presente invención los que han descubierto en primer lugar que la expresión génica puede inhibirse de acuerdo con la estructura de la molécula de ARN monocatenario de la presente invención. Se especula que el efecto inhibitor del gen de la molécula de ARN monocatenario de la presente invención está producido por un fenómeno similar a la interferencia del ARN. Debe señalarse, sin embargo, que la inhibición de la expresión génica en la presente invención no está limitada o restringida a la interferencia del ARN.

45

#### Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La FIG. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ARN monocatenario (no de la presente invención).

50 [FIG. 2] La FIG. 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran otros ejemplos de la molécula de ARN monocatenario de la presente invención.

[FIG. 3] La FIG. 3 muestra vistas esquemáticas que ilustran otros ejemplos de la molécula de ARN monocatenario de la presente invención.

55 [FIG. 4] La FIG. 4 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en un ejemplo de la presente invención.

[FIG. 5] La FIG. 5 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en otro ejemplo de la presente invención.

[FIG. 6] La FIG. 6 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células A549 en otro ejemplo más de la presente invención

60 [FIG. 7] La FIG. 7 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células 293 en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 8] La FIG. 8 es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen TGF-β1 en otro ejemplo más de la presente invención.

65 [FIG. 9] La FIG. 9 es una gráfica que muestra el nivel de expresión de TGF-β1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 10] La FIG. 10 es una gráfica que muestra el número de células en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 11] La FIG. 11 es una gráfica que muestra el número de neutrófilos en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

5 [FIG. 12] La FIG. 12 muestra fotografías que muestran cada una el resultado de la tinción Giemsa de células en una muestra de BALF en el ejemplo de la presente invención.

La Fig. 12A muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). La Fig. 12B muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Fig. 12C muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033(+)).

10 [FIG. 13] La FIG. 13 muestra fotografías, mostrando cada una el resultado de la tinción HE del tejido pulmonar en el ejemplo de la presente invención. La Fig. 13A muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). La Fig. 13B muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Fig. 13C muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033(+)).

15 [FIG. 14] La FIG. 14A muestra el resultado de medir el nivel de expresión del gen TGF- $\beta$ 1 en otro ejemplo más de la presente invención. La Fig. 14B muestra el resultado de medir el nivel de expresión del gen IFN- $\alpha$  en el ejemplo de la presente invención. La Fig. 14C muestra el resultado de medir el nivel de expresión del gen IFN- $\beta$  en el ejemplo de la presente invención.

20 [FIG. 15] La FIG. 15 es una gráfica que muestra el valor relativo del nivel de expresión del gen TGF- $\beta$ 1 en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 16] La FIG. 16 es una gráfica que muestra el valor relativo del nivel de expresión del gen TGF- $\beta$ 1 en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 17] La FIG. 17 es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen TGF- $\beta$ 1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración en otro ejemplo más de la presente invención.

25 [FIG. 18] La FIG. 18A es una gráfica que muestra la cantidad de TNF- $\alpha$  en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención. La Fig. 18B es una gráfica que muestra la cantidad de IFN- $\beta$  en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 19] La FIG. 19 es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen LAMA1 en células 293 en otro ejemplo más de la presente invención.

30 [FIG. 20] La FIG. 20 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen LMNA en células A549 en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 21] La FIG. 21 muestra los ARNss utilizados en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 22] La FIG. 22 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

35 [FIG. 23] La FIG. 23 muestra los ARNss utilizados en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 24] La FIG. 24 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 25] La FIG. 25 muestra los ARNss utilizados en otro ejemplo más de la presente invención.

40 [FIG. 26] La FIG. 26 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 27] La FIG. 27 muestra los ARNss utilizados en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 28] La FIG. 28 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

45 [FIG. 29] La FIG. 29 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 30] La FIG. 30 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células HCT116 en otro ejemplo más de la presente invención.

[FIG. 31] La FIG. 31 es un electroferograma que muestra la resistencia a la ribonucleasa en otro ejemplo más de la presente invención.

50 [FIG. 32] La FIG. 32 es un electroferograma que muestra la resistencia a la nucleasa S7 en otro ejemplo más de la presente invención.

### Modo para realizar la Invención

55 Los términos usados en la presente memoria descriptiva tienen generalmente el significado utilizado en la materia, salvo que se indique de otra forma.

#### 1. molécula de ssNc

60 La molécula de ARN bicatenario de la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una molécula de ARN monocatenario que incluye una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana. La molécula de ARN monocatenario incluye, en secuencia, desde el lado 5' al lado 3': una región en el lado 5' (Xc); una región interna (Z); y una región en el lado 3' (Yc). La región interna (Z) está compuesta por una región interna en el lado 5' (X) y una región interna en el lado 3' (Y) que están unidas entre sí. La región del lado 5' (Xc) es complementaria de la región interna del lado 5' (X). La región del lado 3' (Yc) es complementaria de la región interna del lado 3' (Y). La región interna (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión.

- 5 En la presente invención, "inhibición de la expresión de un gen diana" significa interrumpir la expresión del gen diana, por ejemplo. El mecanismo por el cual se consigue la inhibición no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, una regulación por defecto o un silenciamiento. La inhibición de la expresión del gen diana puede verificarse por una disminución en la cantidad de un producto de transcripción derivado del gen diana; una disminución en la actividad del producto de transcripción; una disminución en la cantidad de un producto de traducción generado a partir del gen diana; una disminución en la actividad del producto de traducción; o similares, por ejemplo. Las proteínas pueden ser proteínas maduras, proteínas precursoras antes de someterse a procesamiento o a modificación posterior a la traducción, o similares, por ejemplo.
- 10 La molécula de ARN monocatenario de la presente invención puede denominarse a partir de ahora en el presente documento molécula de "ssNc" de la presente invención. La molécula de ssNc de la presente invención puede utilizarse para inhibir la expresión de un gen diana in vivo o in vitro, por ejemplo, de tal manera que puede denominarse también "molécula de ssNc para inhibir la expresión de un gen diana" o "inhibidor de la expresión de un gen diana". Además, la molécula de ssNc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana mediante, por ejemplo, la interferencia del ARN, de tal manera que se puede denominar "molécula de ssNc para la interferencia del ARN", "molécula que induce la interferencia del ARN", "agente de interferencia del ARN", o "agente inductor de la interferencia del ARN". La molécula de ssNc de la presente invención puede inhibir también un efecto secundario tal como la inducción del interferón, por ejemplo.
- 15
- 20 En la molécula de ssNc de la presente invención, el extremo 5' y el extremo 3 no están unidos entre sí. De esta manera, la molécula de ssNc de la presente invención puede denominarse también "molécula de ácido nucleico monocatenario lineal". La molécula de ssNc de la presente invención se configura de tal manera que, por ejemplo, en la región interna (Z), la región interna del lado 5' (X) y la región interna del lado 3' (Y) están unidas directamente entre sí.
- 25
- 30 En la molécula de ssNc de la presente invención, la región del lado 5' (Xc) es complementaria de la región interna del lado 5' (X), y la región del lado 3' (Yc) es complementaria de la región interna del lado 3' (Y). De esta manera, en el lado 5', puede formarse una cadena doble mediante el retroplegado de la región (Xc) hacia la región (X) y autohibridación de las regiones (Xc) y (X). En el lado 3', puede formarse una cadena doble mediante el retroplegado de la región (Yc) hacia la región (Y) y autohibridación de las regiones (Yc) e (Y). La molécula de ssNc de la presente invención puede formar intamolecularmente una cadena doble como se ha descrito anteriormente. De esta manera, la estructura de las moléculas de ssNc es totalmente diferente de la estructura del ARN bicatenario obtenido a través de la hibridación de dos ARN monocatenarios separados, tal como el ARNip convencionalmente usado en la interferencia del ARN, por ejemplo.
- 35
- 40 En la molécula de ssNc de la presente invención, la secuencia inhibidora de la expresión es una secuencia que inhibe la actividad de inhibición de la expresión de un gen diana cuando la molécula de ssNc de la presente invención se introduce en una célula in vivo o in vitro, por ejemplo. La secuencia inhibidora de la expresión no está particularmente limitada, y puede ajustarse según sea adecuado dependiendo del tipo de gen diana cuya expresión se va a inhibir. Como secuencia inhibidora de la expresión puede utilizarse, por ejemplo, una secuencia implicada en la interferencia del ADN producida por el ARNip según sea adecuado, por ejemplo. En general, la interferencia del ARN es un fenómeno donde un ARN bicatenario (ARNds) largo se escinde en una célula mediante Dicer para producir un ARN bicatenario (ARNip: ARN interferente pequeño) compuesto por aproximadamente 19 a 21 pares de bases y que tiene un extremo 3' saliente, y uno de los ARN monocatenarios que compone las uniones del ARNip a un ARNm diana para degradar el ARNm, por lo cual se inhibe la traducción del ARNm. Como secuencia del ARN monocatenario de la unión del ARNip al ARNm diana, se han notificado, por ejemplo, varios tipos de genes diana. En la presente invención, por ejemplo, la secuencia del ARN monocatenario del ARNip se puede usar como secuencia inhibidora de la expresión.
- 45
- 50 Debe señalarse que la finalidad de la presente invención no es informar sobre la secuencia de la secuencia inhibidora de la expresión de la secuencia diana. Realmente, la presente invención se refiere a la estructura de una molécula de ácido nucleico que permite la actividad inhibidora de un gen diana conseguida mediante la secuencia inhibidora de expresión que funciona, por ejemplo, en una célula. Por tanto, en la presente invención, se pueden usar como secuencias inhibidoras de la expresión no solo las secuencias del ARN monocatenario del ARNip conocidas en el momento de la presentación de la presente solicitud, sino también las secuencias que se identifiquen en el futuro, por ejemplo.
- 55
- 60 La secuencia inhibidora de la expresión es al menos un 90% complementaria, más preferentemente 95% complementaria, aún más preferentemente 98% complementaria, y de forma particularmente preferente 100% complementaria de una región predeterminada del gen diana, por ejemplo. Cuando la secuencia inhibidora de la expresión satisface la complementariedad anteriormente descrita, se puede reducir suficientemente un efecto fuera de especificaciones, por ejemplo.
- 65
- Los ejemplos específicos de las secuencias inhibidoras de la expresión son los siguientes: cuando el gen diana es el gen GAPDH, se puede usar una secuencia 19-mer que se muestra en la SEC ID N°: 1, por ejemplo; cuando el gen diana es el gen TGF-β1, se puede usar una secuencia 21-mer que se muestra en la SEC ID N°: 16, por ejemplo; cuando el gen diana es el gen LAMA1, se puede usar una secuencia 19-mer que se muestra en la SEC ID N°: 5, por ejemplo; y cuando el gen diana es el gen LMNA, se puede usar una secuencia 19-mer que se muestra en la SEC ID N°:

6, por ejemplo.

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (SEC ID N°: 1)  
 5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3' (SEC ID N°: 16)  
 5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (SEC ID N°: 5)  
 5'-UUGGCGUUUUUGGUGACGC-3' (SEC ID N°: 6)

Se especula que la inhibición de la expresión de un gen diana por la molécula ssNc de la presente invención se consigue mediante la interferencia del ARN o de un fenómeno similar a la interferencia del ARN (fenómeno similar a la interferencia del ARN) producido por la estructura de la molécula de ssNc donde se incluye la secuencia inhibidora de la expresión en al menos una región interna (Z), la región en el lado 5' (Xc), y la región en el lado 3' (Yc), por ejemplo. Debe señalarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada por este mecanismo. A diferencia del denominado ARNip, la molécula de ssNc de la presente invención no se introduce en una célula o similar en la forma de ARNds compuesto por dos ARN bicatenarios, y no es siempre necesario escindir la secuencia inhibidora de la expresión en la célula, por ejemplo. Por tanto; puede decirse que la molécula de ssNc de la presente invención exhibe una función análoga a la interferencia del ARN, por ejemplo.

En la molécula de ssNc de la presente invención, la secuencia inhibidora de la expresión está incluida en la región interna (Z), como se ha descrito anteriormente. La molécula de ssNc de la presente invención incluye una secuencia inhibidora de la expresión.

Como se ha descrito anteriormente, la región interna (Z) está compuesta por una región interna en el lado 5' (X) y una región interna en el lado 3' (Y) que están unidas entre sí. Las regiones (X) e (Y) están unidas directamente entre sí sin que exista, por ejemplo, ninguna secuencia intermedia entre ellas. La región interna (Z) se describe como "compuesta de la región interna del lado 5' (X) y la región interna del lado 3' (Y) que están unidas entre sí" meramente para indicar el contexto de la secuencia entre la región del lado 5' (Xc) y la región del lado 3' (Yc). La secuencia inhibidora de la expresión puede estar dispuesta de manera que se extienda a través de las regiones (X) e (Y) en la región interna (Z).

En la molécula de ssNc de la presente invención, la región del lado 5' (Xc) es complementaria de la región interna del lado 5' (X). Solo es necesario que la región (Xc) tenga una secuencia complementaria de toda la región, o parte de la región (X). Específicamente, por ejemplo, es preferible que la región (Xc) incluya o esté compuesta de una secuencia complementaria de toda la región, o parte de la región (X). La región (Xc) puede ser perfectamente complementaria de toda la región, o parte de la región (X), o una o unas pocas bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias a la misma, por ejemplo. Preferentemente, la región (Xc) es perfectamente complementaria de la misma. En la molécula de ssNc de la presente invención, la región del lado 3' (Yc) es complementaria de la región interna del lado 3' (Y). Solo es necesario que la región (Yc) tenga una secuencia complementaria de toda la región, o parte de la región (Y). Específicamente, por ejemplo, es preferible que la región (Yc) incluya o esté compuesta de una secuencia complementaria de toda la región, o parte de la región (Y). La región (Yc) puede ser perfectamente complementaria de toda la región, o parte de la región (Y), o una o unas pocas bases en la región (Yc) pueden no ser complementarias a la misma, por ejemplo. Preferentemente, la región (Yc) es perfectamente complementaria de la misma. La expresión "una o unas pocas bases" significa, por ejemplo, 1 a 3 bases, preferentemente 1 base o 2 bases.

En la molécula de ssNc de la presente invención, la región del lado 5' (Xc) y la región interna del lado 5' (X) están unidas entre sí mediante una región enlazadora (Lx).

En la molécula de ssNc de la presente invención, la región del lado 3' (Yc) y la región interna del lado 3' (Y) están unidas entre sí mediante una región enlazadora (Ly).

La molécula de ssNc de la presente invención tiene ambas regiones enlazadoras (Lx) y (Ly).

Cada una de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) tienen una estructura tal que no se produce la autohibridación en su interior.

La Fig. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ssNc que no está de acuerdo con la presente invención, que no incluyen la región enlazadora. La Fig. 1A es una vista esquemática que muestra el orden de las respectivas regiones desde el lado 5' al lado 3' de la molécula de ssNc. La Fig. 1B es una vista esquemática que muestra el estado cuando se forman dobles cadenas en la molécula de ssNc. Tal como se muestra en la FIG. 1B, en la molécula de ssNc, la región del lado 5' (Xc) se pliega hacia atrás, por lo cual se forma una cadena doble en la región del lado 5' (Xc) y en la región interna del lado 5' (X), y la región del lado 3' (Yc) se pliega hacia atrás, por lo cual se forma una cadena doble en la región del lado 3' (Yc) y en la región interna del lado 3' (Y). Las vistas esquemáticas que se muestran en la FIG. 1 ilustran meramente el orden en el cual las respectivas regiones se unen entre sí y la relación de posición de las respectivas regiones que forman las cadenas dobles, y no limitan la longitud y similitudes de cada región, por ejemplo.

La Fig. 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ssNc de la presente invención, incluyendo las regiones enlazadoras. La Fig. 2A es una vista esquemática que muestra el orden de las respectivas

regiones desde el lado 5' al lado 3' en la molécula de ssNc, como ejemplo ilustrativo. La Fig. 2B es una vista esquemática que muestra el estado cuando se forman dobles cadenas en la molécula de ssNc. Tal como se muestra en la FIG. 2B, en la molécula de ssNc, las cadenas dobles se forman entre la región del lado 5' (Xc) y la región interna del lado 5' (X) y entre la región interna del lado 3' (Y) y la región del lado 3' (Yc), respectivamente, y cada una de la región Lx y la región Ly tiene una estructura de bucle. Las vistas esquemáticas que se muestran en la FIG. 2 ilustran meramente el orden en el cual las respectivas regiones se unen entre sí y la relación de posición de las respectivas regiones que forman las cadenas dobles, y no limitan la longitud y similitudes de cada región, por ejemplo.

En la molécula de ssNc de la presente invención, el número de bases en cada una de las regiones del lado 5' (Xc), la región interna del lado 5' (X), la región interna del lado 3' (Y), y la región del lado 3' (Yc) no está particularmente limitada, y puede ser de la siguiente forma, por ejemplo. En la presente invención, "el número de bases" significa la "longitud", por ejemplo, y también puede denominarse la "longitud base".

Como se ha descrito anteriormente, la región del lado 5' (Xc) puede ser complementaria de toda la región de la región interna del lado 5' (X), por ejemplo. En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región (Xc) tenga igual longitud de bases que la región (X), y esté compuesta de una secuencia de bases complementaria de toda la región que se extiende desde el extremo 5' al extremo 3' de la región (X). Es más preferible que la región (Xc) tenga igual longitud de bases que la región (X), y que todas las bases de la región (Xc) sean complementarias de todas las bases en la región (X), es decir, la región (Xc) es perfectamente complementaria de la región (X), por ejemplo. Debe señalarse, sin embargo, que la configuración de la región (Xc) no está limitada a la anterior, y una o unas pocas bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias de las correspondientes bases en la región (X), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, la región del lado 5' (Xc) puede ser complementaria de parte de la región de la región interna del lado 5' (X), por ejemplo. En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X), es decir, la región (Xc) está compuesta de una secuencia de bases cuya longitud de bases es más corta que la longitud de bases de la región (X) en una o más bases. Es más preferible que la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X) y que todas las bases de la región (Xc) sean complementarias de todas las bases de la parte de la región (X), es decir, la región (Xc) es perfectamente complementaria de la parte de la región (X), por ejemplo. La parte de la región (X) es preferentemente una región (segmento) que tiene una secuencia de bases compuesta de bases sucesivas comenzando desde la base del extremo 5' (la 1ª base) de la región (X), por ejemplo.

Como se ha descrito anteriormente, la región del lado 3' (Yc) puede ser complementaria de toda la región de la región interna del lado 3' (Y), por ejemplo. En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región (Yc) tenga igual longitud de bases que la región (Y), y esté compuesta de una secuencia de bases complementaria de toda la región que se extiende desde el extremo 5' al extremo 3' de la región (Y). Es más preferible que la región (Yc) tenga igual longitud de bases que la región (Y), y que todas las bases de la región (Yc) sean complementarias de todas las bases en la región (Y), es decir, la región (Yc) es perfectamente complementaria de la región (Y), por ejemplo. Debe señalarse, sin embargo, que la configuración de la región (Yc) no está limitada a la anterior, y una o unas pocas bases en la región (Yc) pueden no ser complementarias de las correspondientes bases en la región (Y), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, la región del lado 3' (Yc) puede ser complementaria de parte de la región de la región interna del lado 3' (Y), por ejemplo. En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y), es decir, la región (Yc) está compuesta de una secuencia de bases cuya longitud de bases es más corta que la longitud de bases de la región (Y) en una o más bases. Es más preferible que la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y) y que todas las bases de la región (Yc) sean complementarias de todas las bases de la parte de la región (Y), la región (Yc) es perfectamente complementaria de la parte de la región (Y), por ejemplo. La parte de la región (Y) es preferentemente una región (segmento) que tiene una secuencia de bases compuesta de bases sucesivas comenzando desde la base del extremo 3' (la 1ª base) de la región (Y), por ejemplo.

En la molécula de ssNc de la presente invención, la relación del número de bases (Z) en la región interna (Z) con el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Y) de la región interna del lado 3' (Y), y la relación del número de bases (Z) de la región interna (Z) con el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Xc) de la región del lado 5' (Xc) satisface las condiciones de las Expresiones (1) y (2), por ejemplo.

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2)$$

En la molécula de ssNc de la presente invención, la relación de longitud entre el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Y) de la región interna del lado 3' (Y) no está particularmente limitada, y puede satisfacer cualquiera de las condiciones de las siguientes expresiones, por ejemplo.

$$\mathbf{X = Y \quad \dots (19)}$$

$$\mathbf{X < Y \quad \dots (20)}$$

$$\mathbf{X > Y \quad \dots (21)}$$

5 En la molécula de ssNc de la presente invención, la relación entre el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Xc) de la región del lado 5' (Xc), y la relación entre el número de bases (Y) de la región interna del lado 3' (Y) y el número de bases (Yc) de la región interna del lado 3' (Yc) satisface cualquiera de las siguientes condiciones (a) a (d), por ejemplo.

10 (a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (3) y (4).

$$\mathbf{X > Xc \quad \dots (3)}$$

$$\mathbf{Y = Yc \quad \dots (4)}$$

(b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (5) y (6).

$$\mathbf{X = Xc \quad \dots (5)}$$

$$\mathbf{Y > Yc \quad \dots (6)}$$

15 (c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (7) y (8).

$$\mathbf{X > Xc \quad \dots (7)}$$

$$\mathbf{Y > Yc \quad \dots (8)}$$

20 (d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (9) y (10).

$$\mathbf{X = Xc \quad \dots (9)}$$

$$\mathbf{Y = Yc \quad \dots (10)}$$

25 En las condiciones (a) a (d) anteriormente descritas, la diferencia entre el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Xc) de la región del lado 5' (Xc), y la diferencia entre el número de bases (Y) de la región interna del lado 3' (Y) y el número de bases (Yc) de la región interna del lado 3' (Yc) satisface preferentemente las siguientes condiciones (a) a (d), por ejemplo.

(a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (11) y (12).

$$\mathbf{X - X_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2, 3 \text{ o } 4, \text{ y m\u00e1s preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots \text{ (11)}}$$

$$\mathbf{Y - Y_c = 0 \quad \dots \text{ (12)}}$$

(b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (13) y (14).

$$\mathbf{\bar{X} - X_c = 0 \quad \dots \text{ (13)}}$$

$$\mathbf{Y - Y_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2, 3 \text{ o } 4, \text{ y m\u00e1s preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots \text{ (14)}}$$

5

(c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (15) y (16).

$$\mathbf{X - X_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2, \text{ o } 3, \text{ y m\u00e1s preferentemente } 1, \text{ o } 2 \quad \dots \text{ (15)}}$$

$$\mathbf{Y - Y_c = 0 \quad \dots \text{ (16)}}$$

10

(d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (17) y (18).

$$\mathbf{X - X_c = 0 \quad \dots \text{ (17)}}$$

$$\mathbf{Y - \bar{Y}_c = 0 \quad \dots \text{ (18)}}$$

15

20

25

Con respecto a las mol\u00e9culas de ssNc que satisfacen las condiciones (a) a (d), se muestran los ejemplos de sus estructuras respectivamente en las vistas esquem\u00e1ticas de la FIG. 3. La Fig. 3 muestra las mol\u00e9culas de ssNc que incluyen las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly). La Fig. 3A muestra un ejemplo de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (a); La Fig. 3B muestra un ejemplo de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (b); La Fig. 3C muestra un ejemplo de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (c); y la Fig. 3D muestra un ejemplo de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (d). En la FIG. 3, las l\u00edneas punteadas indican un estado donde se forman cadenas dobles mediante autohibridaci\u00f3n. Las mol\u00e9culas de ssNc que se muestran en la FIG. 3 se dirigen todas a los ejemplos donde la relaci\u00f3n entre el n\u00famero de bases (X) en la regi\u00f3n interna del lado 5' (X) y el n\u00famero de bases (Y) en la regi\u00f3n interna del lado 3' (Y) satisface "X < Y" de la expresi\u00f3n (20). Debe sealarse, sin embargo, que la relaci\u00f3n no est\u00e1 limitada a la anterior, y se puede satisfacer "X = Y" de la expresi\u00f3n (19) o "X > Y" de la expresi\u00f3n (21). Las vistas esquem\u00e1ticas que se muestran en la FIG. 3 ilustran meramente la relaci\u00f3n entre la regi\u00f3n interna del lado 5' (X) y la regi\u00f3n del lado 5' (Xc) y la relaci\u00f3n entre la regi\u00f3n interna del lado 3' (Y) y la regi\u00f3n del lado 3' (Yc), y no limitan la longitud, la forma, y similitudes de cada regi\u00f3n, y tambi\u00e9n la presencia o ausencia de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly), por ejemplo.

30

35

Cada una de las mol\u00e9culas de ssNc que satisfacen las dolencias (a) a (c) se configura de tal manera que, por ejemplo, cuando las cadenas dobles se forman entre la regi\u00f3n del lado 5' (Xc) y la regi\u00f3n interna del lado 5' (X) y en la regi\u00f3n del lado 3' (Yc) y la regi\u00f3n interna del lado 3' (Y), respectivamente, la regi\u00f3n interna (Z) incluye al menos una base que no se puede alinear con cualquiera de la regi\u00f3n del lado 5' (Xc) y la regi\u00f3n del lado 3' (Yc). En la regi\u00f3n interna (Z), la base que no se puede alinear (una base que no forma la cadena doble) se denomina tambi\u00e9n a partir de ahora en el presente documento "base no emparejada". En la FIG. 3, una regi\u00f3n compuesta de base(s) no emparejadas se muestra como "F". El n\u00famero de bases en la regi\u00f3n (F) no est\u00e1 particularmente limitado. El n\u00famero de bases (F) en la regi\u00f3n (F) es como sigue, por ejemplo: "Xc - X" en el caso de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (a); "Y-Yc" en el caso de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (b); y el total de "Xc - X" e "Y - Yc" en el caso de la mol\u00e9cula de ssNc que satisface la condici\u00f3n (c).

Por otra parte, la molécula de ssNc que satisface la condición (d) se configura de tal manera que, por ejemplo, toda la región de la región interna (Z) se alinea con la región del lado 5' (Xc) y la región del lado 3' (Yc), en otras palabras, la región completa de la región interna (Z) forma una cadena doble. En la molécula de ssNc que satisface la condición (d), el extremo 5' de la región del lado 5' (Xc) y el extremo 3' de la región del lado 3' (Yc) no están unidos entre sí.

Se proporcionan a continuación ejemplos de las longitudes de las regiones respectivas de la molécula de ssNc de la presente invención. Debe señalarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada en absoluto a lo anterior. En la presente invención, por ejemplo, el intervalo numérico relativo al número de bases describe todos los enteros positivos que se encuentran comprendidos en este intervalo. Por ejemplo, la descripción "1 a 4 bases" describe las "1, 2, 3, y 4 bases (se aplica lo mismo a partir de ahora en el presente documento).

El número total de bases de la región del lado 5' (Xc), las bases de la región del lado 3' (Yc), y las bases desemparejadas (F) de la región interna (Z) son por ejemplo iguales al número de bases de la región interna (Z). De esta manera, la longitud de la región del lado 5' (Xc) y la longitud de la región del lado 3' (Yc) se puede considerar adecuada dependiendo por ejemplo de la longitud de la región interna (Z), el número de bases desemparejadas (F), y las posiciones de las bases desemparejadas, por ejemplo.

El número de bases de la región interna (Z) es 19 o más. El límite inferior del número de bases es 19, preferentemente 20, y más preferentemente 21. El límite superior del número de bases es 30. Un ejemplo específico del número de bases de la región interna (Z) es 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30.

La región interna (Z) puede ser una región compuesta solamente por la secuencia inhibidora de la expresión o una región que incluya la secuencia inhibidora de la expresión, por ejemplo. El número de bases de la secuencia inhibidora de la expresión es, por ejemplo, 19 a 30, preferentemente 19, 20, o 21. La secuencia inhibidora de la expresión puede tener adicionalmente una secuencia adicional en su lado 5' y/o lado 3'. El número de bases en la secuencia adicional es preferentemente 1 a 21, más preferentemente de 1 a 11, y de forma aún más preferible de 1 a 7.

El número de bases en la región del lado 5' (Xc) es de 1 a 7, preferentemente de 1 a 4, y de forma particularmente preferente 1, 2, o 3.

El número de bases en la región del lado 3' (Yc) es preferente de 1 a 7, más preferentemente de 1 a 4, y de forma particularmente preferente 1, 2, o 3.

Como se ha descrito anteriormente, la relación entre el número de bases en la región interna (Z), el número de bases en la región del lado 5' (Xc), y el número de bases en la región del lado 3' (Yc) puede expresarse mediante la expresión (2): " $Z \geq Xc + Yc$ ", por ejemplo. Específicamente, el número de bases representadas por " $Xc + Yc$ " es igual al número de bases en la región interna (Z), o inferior al número de bases en la región interna (Z), por ejemplo. En el último caso, " $Z - (Xc + Yc)$ " es 1 a 10, preferentemente de 1 a 4, y más preferentemente 1, 2, o 3. La expresión " $Z - (Xc + Yc)$ " corresponde al número de bases (F) en la región de bases desemparejadas (F) de la región interna (Z), por ejemplo.

En la molécula de ssNc de la presente invención, las longitudes de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) no están particularmente limitadas. La longitud de la región enlazadora (Lx) es preferentemente tal que, por ejemplo, la región interna del lado 5' (X) y la región del lado 5' (Xc) pueden formar una cadena doble. La longitud de la región enlazadora (Ly) es preferentemente tal que, por ejemplo, la región interna del lado 3' (Y) y la región del lado 3' (Yc) pueden formar una cadena doble. El número de bases en la región enlazadora (Lx) puede ser igual a o diferente del número de bases en la región enlazadora (Ly). Asimismo, sus secuencias de bases pueden ser iguales o diferentes. El límite inferior del número de bases en cada una de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) es 3, y el límite superior del mismo es 50. El número de bases en cada una de las regiones enlazadoras es específicamente un máximo de 50, máximo de 30, máximo de 20, máximo de 10, máximo de 7, o un máximo de 4, por ejemplo, pero no se limitan a estos ejemplos.

La longitud completa de la molécula de ssNc de la presente invención no está particularmente limitada. En la molécula de ssNc de la presente invención, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula de ssNc de longitud completa), es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, aún más preferentemente 51, y de forma particularmente preferente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, aún más preferentemente 100, y de forma particularmente preferente 80. En la molécula de ssNc de la presente invención, el límite inferior del número total de bases excluyendo las que se encuentran en las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, aún más preferentemente 51, y de forma particularmente preferente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, aún más preferentemente 100, y de forma particularmente preferente 80.

Los componentes de la molécula de ssNc de la presente invención no están particularmente limitados. Sin embargo, los restos de nucleótidos son restos de ribonucleótidos. El resto de nucleótido puede ser uno que no está modificado (resto de nucleótido no modificado) o uno que se ha modificado (resto de nucleótido modificado), por ejemplo. Si se configura la molécula de ssNc de la presente invención de manera que incluya un resto de nucleótido modificado, por ejemplo, se puede aumentar la resistencia de la molécula de ssNc a las nucleasas, permitiendo por tanto que aumente

la estabilidad de la molécula de ssNc. Además, la molécula de ssNc de la presente invención puede incluir adicionalmente, por ejemplo, un resto no nucleótido además del resto nucleótido. Los detalles del resto nucleótido y del resto no nucleótido se describirán a continuación.

5 En la molécula de ssNc de la presente invención, el resto nucleótido se prefiere como el componente de cada una de la región interna (Z), la región en el lado 5' (Xc), y la región del lado 3' (Yc). Cada una de las regiones está compuesta de cualquiera de los siguientes restos (1) a (3), por ejemplo.

- 10 (1) un(os) resto(s) nucleótidos sin modificar  
 (2) un(os) resto(s) nucleótidos modificados  
 (3) un(os) resto(s) nucleótidos sin modificar y un(os) resto(s) nucleótidos modificados

15 En la molécula de ssNc de la presente invención, los componentes de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) no están particularmente limitados, y sus ejemplos incluyen los restos nucleótidos anteriormente descritos. Cada una de las regiones enlazadoras puede estar compuesta solo de los restos nucleótidos. Cada una de las regiones enlazadoras está compuesta de cualquiera de los siguientes restos (1) a (3), por ejemplo.

- 20 (1) restos nucleótidos sin modificar  
 (2) restos nucleótidos modificados; y  
 (3) restos nucleótidos sin modificar y restos nucleótidos modificados.

Los componentes de ambas regiones (Lx) y (Ly) pueden ser iguales o diferentes, por ejemplo. Los ejemplos específicos son tales que los componentes de ambas regiones son restos nucleótidos.

25 Los ejemplos de la molécula de ssNc de la presente invención incluyen: moléculas compuestas solamente de restos de nucleótidos; y moléculas que incluyen el(los) resto(s) no nucleótido(s) además de los restos nucleótidos. En la molécula de ssNc de la presente invención, los restos nucleótidos pueden ser restos nucleótidos sin modificar solamente; los restos nucleótidos modificados solo; o el(los) resto(s) nucleótidos sin modificar y el(los) resto(s) nucleótido(s) modificado(s), como se ha descrito anteriormente, por ejemplo. Cuando la molécula de ssNc incluye  
 30 el(los) resto(s) nucleótido(s) sin modificar y el(los) resto(s) nucleótido(s) modificado(s), el número de resto(s) nucleótidos modificados no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, 1 a 5, preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 1 a 3, y lo más preferente 1 o 2. Cuando la molécula de ssNc de la presente invención incluye el(los) resto(s) no nucleótido(s), el número de resto(s) no nucleótido(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 4, o 1, 2,  
 35 o 3.

En la molécula de ssNc de la presente invención, el resto nucleótido es un resto de ribonucleótido. De esta manera, la molécula de ssNc de la presente invención se denomina también "molécula de ARN" o "molécula de ARNss", por ejemplo. Los ejemplos de molécula de ARNss incluyen: moléculas compuestas solamente de restos ribonucleótidos; y  
 40 una molécula que incluye el(los) restos no nucleótidos además de los restos nucleótidos. Como se ha descrito anteriormente, como restos ribonucleótidos, la molécula de ARNss puede incluir: solamente restos ribonucleótidos sin modificar; solamente restos ribonucleótidos modificados; o tanto resto(s) ribonucleótido(s) no modificados como resto(s) ribonucleótido(s) modificado(s), por ejemplo.

45 Cuando la molécula de ARNss incluye resto(s) ribonucleótido(s) modificado(s) además de restos ribonucleótidos sin modificar, por ejemplo, el número de resto(s) ribonucleótido(s) modificado(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, 1 a 5, preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 1 a 3, y lo más preferente 1 o 2. El resto de ribonucleótido modificado, a diferencia del resto de ribonucleótido sin modificar, puede ser el resto de desoxirribonucleótido obtenido sustituyendo un resto de ribosa por un resto de desoxirribosa, por  
 50 ejemplo. Cuando la molécula de ARNss incluye resto(s) desoxirribonucleótido(s) modificado(s) además de resto(s) ribonucleótidos sin modificar, por ejemplo, el número de resto(s) desoxirribonucleótido(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, 1 a 5, preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 1 a 3, y lo más preferente 1 o 2.

55 La molécula de ssNc de la presente invención puede incluir una sustancia marcadora (marcador), y puede marcarse con la sustancia marcadora, por ejemplo. La sustancia marcadora no está particularmente limitada, y puede ser una sustancia fluorescente, un colorante, un isótopo, o similares, por ejemplo. Los ejemplos de la sustancia fluorescente incluyen: fluoróforos tales como pireno, TAMRA, fluoresceína, un colorante Cy3, y un colorante Cy5. Los ejemplos del colorante incluyen colorantes Alexa tales como Alexa 488. Los ejemplos del isótopo incluyen isótopos y radioisótopos  
 60 estables. Entre ellos, son preferibles los isótopos estables. Los isótopos estables tienen un riesgo bajo de exposición a la radiación, y no requieren instalaciones especializadas, por ejemplo. De esta manera, los isótopos estables tienen una capacidad de manipulación excelente y pueden contribuir a la reducción de costes. Además, un isótopo estable no cambia las propiedades físicas de un compuesto marcado con él, por ejemplo, y de esta manera tiene una excelente propiedad como trazador. El isótopo estable no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O,  
 65 <sup>18</sup>O, <sup>33</sup>S, <sup>34</sup>S, y, <sup>36</sup>S.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ssNc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana. De esta manera, la molécula de ssNc de la presente invención se puede usar como un agente terapéutico para tratar una enfermedad producida por un gen, por ejemplo. Cuando la molécula de ssNc incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que produce la enfermedad, por ejemplo, es posible tratar la enfermedad inhibiendo la expresión del gen diana. En la presente invención, el término "tratamiento" abarca: la prevención de enfermedades; la mejoría de las enfermedades; y la mejora del pronóstico, por ejemplo, y puede significar cualquiera de ellos.

El método de utilizar la molécula de ssNc de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, la molécula de ssNc puede administrarse a un sujeto que tiene el gen diana.

Los ejemplos del sujeto al cual se administra la molécula de ssNc de la presente invención incluyen células, tejidos, y órganos. Los ejemplos del sujeto incluyen también seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede llevarse a cabo in vivo o in vitro, por ejemplo. Las células no están particularmente limitadas, y sus ejemplos incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3, y células COS; citoblastos tales como citoblastos ES y citoblastos hematopoyéticos; y células aisladas a partir de organismos vivos, tales como células primarias cultivadas.

En la presente invención, el gen diana cuya expresión se va a inhibir no está particularmente limitado, y cualquier gen deseado puede ajustarse al gen diana. Tras el ajuste al gen diana, la secuencia inhibidora de la expresión puede diseñarse como adecuada dependiendo del tipo del gen diana, como se ha descrito anteriormente.

Se proporcionarán a continuación ejemplos específicos de la molécula de ssNc de la presente invención. Debe señalarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada en absoluto a lo anterior. Los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula de ssNc incluyen: las secuencias de bases de las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 7, 8, 13, 14, 29 a 35, 37, 43, 44, 47, 48, y 51 a 80; y las secuencias de bases obtenidas mediante, por ejemplo, deleciones, sustituciones, y/o adiciones de una o más bases en estas secuencias de bases. Cuando el gen diana es el gen GAPDH, los ejemplos de las secuencias de bases de la molécula de ssNc incluyen las secuencias de bases de las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 7, 8, 13, 37 y 51 a 80. Cuando el gen diana es el TGF- $\beta$ 1, los ejemplos de las secuencias de bases de la molécula de ssNc incluyen las secuencias de bases de las SEC ID N<sup>os</sup>: 14 y 29 a 35. Cuando el gen diana es el gen LAMA1, los ejemplos de las secuencias de bases de la molécula de ssNc incluyen las secuencias de bases de las SEC ID N<sup>os</sup>: 43 y 44. Cuando el gen diana es el gen LMNA, los ejemplos de las secuencias de bases de la molécula de ssNc incluyen las secuencias de bases de las SEC ID N<sup>os</sup>: 47 y 48.

La siguiente descripción puede hacer referencia al uso de la molécula de ssNc de la presente invención, con respecto a la composición, al método inhibitorio, al método de tratamiento, y similares.

Como la molécula de ssNc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana como se ha descrito anteriormente, es útil como composición farmacéutica, un agente diagnóstico, un fitoquímico, y una herramienta para realizar investigaciones sobre químicos, ciencia médica, ciencias de la vida, y similares, por ejemplo.

## 2. Resto nucleótido

El resto nucleótido incluye, como sus componentes, un azúcar, una base, y un fosfato. El resto nucleótido es un resto ribonucleótido, como se ha descrito anteriormente. El resto ribonucleótido tiene, por ejemplo: un resto ribosa como el azúcar; y adenina (A), guanina (G), citosina (C), o uracilo (U) como la base.

El resto nucleótido puede ser, por ejemplo, un resto nucleótido sin modificar o un resto nucleótido modificado. Los componentes del resto nucleótido sin modificar son iguales o sustancialmente iguales a los componentes de un resto nucleótido que se produce naturalmente, por ejemplo. Preferentemente, los componentes son iguales o sustancialmente iguales a los componentes de un resto nucleótido que se produce naturalmente en el cuerpo humano.

El resto nucleótido modificado es un resto nucleótido obtenido, por ejemplo, modificando el resto nucleótido sin modificar. El resto nucleótido modificado puede ser por ejemplo tal que cualquiera de los componentes del resto nucleótido sin modificar está modificado. En la presente invención, "modificación" significa, por ejemplo: sustituciones, adiciones, y/o deleciones de cualquiera de los componentes; y sustituciones, adiciones, y/o deleciones de un(os) átomo(s) y/o un(os) grupo(s) funcional(es) de los componente(s). Puede denominarse también "alteración". Los ejemplos del resto nucleótido modificado incluyen restos nucleótidos naturales y restos nucleótidos modificados artificialmente. Con respecto a los restos nucleótidos modificados derivados naturalmente, puede citarse, por ejemplo Limbach et al. (1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22: pp. 2183 a 2196). El resto nucleótido modificado puede ser, por ejemplo, un resto de una alternativa del nucleótido.

Los ejemplos de la modificación del resto nucleótido incluyen la modificación de la estructura de ribosa-fosfato (denominada a partir de ahora en el presente documento "estructura de ribofosfato").

En la estructura de ribofosfato, puede modificarse por ejemplo un resto de ribosa. En el resto de ribosa, por ejemplo, el carbono de la posición 2' puede estar modificado. Específicamente, un grupo hidroxilo unido al carbono de la posición 2' puede estar sustituido, por ejemplo, con hidrógeno o un halógeno tal como flúor. Mediante la sustitución del grupo hidroxilo unido al carbono de la posición 2' con hidrógeno, es posible sustituir el resto de ribosa con desoxirribosa. El resto de ribosa puede estar sustituido por ejemplo con su estereoisómero, y puede estar sustituido por ejemplo con un resto de arabinosa por ejemplo.

La estructura principal de ribofosfato puede estar sustituida por ejemplo con una estructura principal sin ribofosfato que no tiene un resto de ribosa y/o no tiene un resto de fosfato. La estructura principal sin ribofosfato puede ser, por ejemplo, la estructura principal de ribosofosfato modificada de tal manera que no esté cargada. Los ejemplos de una alternativa obtenidos sustituyendo la estructura principal de ribofosfato por la estructura principal sin ribofosfato en el nucleótido incluyen morfolino, ciclobutilo, y pirrolidina. Otros ejemplos de la alternativa incluyen restos artificiales de monómero de ácido nucleico. Sus ejemplos específicos incluyen PNA (ácido nucleico peptídico), LNA (ácido nucleico bloqueado), y ENA (ácido nucleico con un puente de 2'-O,4'-C-etileno). Entre ellos, es preferible PNA.

En la estructura de ribofosfato, puede estar modificado un grupo fosfato, por ejemplo. En la estructura del ribofosfato, un grupo fosfato en la proximidad más cercana al resto de azúcar se denomina un "grupo  $\alpha$ -fosfato". El grupo  $\alpha$ -fosfato está cargado negativamente, y las cargas eléctricas se distribuyen uniformemente sobre dos átomos de oxígeno que no están unidos al resto de azúcar. Entre los cuatro átomos de oxígeno del grupo  $\alpha$ -fosfato, los dos átomos de oxígeno no unidos al resto de azúcar en el enlace fosfodiéster entre los restos nucleótidos se denominan a partir de ahora en el presente documento "oxígenos no enlazantes". Por otra parte, los dos átomos de oxígeno que están unidos al resto de azúcar en el enlace fosfodiéster en los restos nucleótidos se denominan a partir de ahora en el presente documento "oxígenos enlazantes". El grupo  $\alpha$ -fosfato está modificado preferiblemente de tal manera que esté descargado, o de manera que, por ejemplo, la distribución de carga entre los oxígenos no enlazantes sea asimétrica, por ejemplo.

En el grupo fosfato, el(los) oxígeno(s) no enlazante(s) puede(n) estar sustituido(s), por ejemplo. El(los) oxígeno(s) puede(n) estar sustituido(s) con un átomo seleccionado entre S (azufre), Se (selenio), B (boro), C (carbono), H (hidrógeno), N (nitrógeno), y OR (R es un grupo alquilo o un grupo arilo), por ejemplo, y es preferible la sustitución con S. Es preferible que se sustituyan ambos oxígenos no enlazantes, por ejemplo, y es más preferible que ambos oxígenos no enlazantes se sustituyan con S. Los ejemplos de los grupos fosfato modificados de esta manera incluyen fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforoamidatos, alquil o aril fosfonatos, y fosfotriésteres. En particular, es preferible el fosforoditioato donde ambos oxígenos no enlazantes están sustituidos con S.

En el grupo fosfato, el(los) oxígeno(s) enlazante(s) puede(n) estar sustituido(s), por ejemplo. El(los) oxígeno(s) puede(n) estar sustituido(s) con un átomo seleccionado entre S (azufre), C (carbono), y N (nitrógeno), por ejemplo. Los ejemplos del grupo fosfato modificado de esta manera incluyen: fosforoamidatos con puente resultantes de la sustitución con N; fosforotioatos con puente resultantes de la sustitución con S; y metilfosfonatos con puente resultantes de la sustitución con C. Preferentemente, la sustitución del(de los) oxígeno(s) enlazante(s) se lleva a cabo, por ejemplo, en al menos uno del resto nucleótido del extremo 5' y el resto nucleótido del extremo 3' de la molécula de ssNc de la presente invención, por ejemplo. Cuando la sustitución se lleva a cabo en el lado 5', es preferible la sustitución con C. Cuando la sustitución se lleva a cabo en el lado 3', es preferible la sustitución con N.

El grupo fosfato puede estar sustituido con un enlazador exento de fosfato, por ejemplo. El enlazador puede contener siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformoacetal, formacetal, oxima, metileneimino, metileneimilino, metilenehidrazo, metilendimetilhidrazo, metilenoximetilimino, o similares. Preferentemente, el enlazador puede contener un grupo metilencarbonil amino y un grupo metileneimilino.

En la molécula de ssNc de la presente invención, por ejemplo, al menos uno de un resto nucleótido en el extremo 3' y un resto nucleótido en el extremo 5' pueden estar modificados. El resto nucleótido de uno cualquiera del extremo 3' y del extremo 5' puede estar modificado, o, por ejemplo, los restos nucleótidos en el extremo 3' y el extremo 5' pueden estar modificados. La modificación puede ser como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, y es preferible modificar un(os) grupo(s) fosfato en el(los) extremo(s). El grupo fosfato completo puede estar modificado, o por ejemplo, uno o más átomos del grupo fosfato puede(n) estar modificados. En el primer caso, por ejemplo, el grupo fosfato completo puede estar sustituido o eliminado.

La modificación del(de los) resto(s) nucleótido(s) en el(los) extremo(s) puede ser, por ejemplo, la adición de cualquier otra molécula. Los ejemplos de las otras moléculas incluyen moléculas funcionales tales como sustancias marcadoras que se han descrito anteriormente y grupos protectores. Los ejemplos de grupos protectores incluyen S (azufre), Si (silicio), B (boro), y grupos que contienen ésteres. Se pueden usar moléculas funcionales tales como, por ejemplo, sustancias marcadoras en la detección y similares de la molécula de ssNc de la presente invención.

La otra molécula puede añadirse al grupo fosfato del resto nucleótido, o puede añadirse por ejemplo al grupo fosfato del resto de azúcar mediante un separador. El átomo terminal del separador puede añadirse o sustituirse por uno cualquiera de los oxígenos enlazantes del grupo fosfato, u O, N, S, o C del resto de azúcar, por ejemplo. El sitio de

unión en el resto de azúcar es preferentemente, por ejemplo, C en la posición 3', C en la posición 5', o cualquier átomo unido a los anteriores. El separador también se puede añadir o sustituirse, por ejemplo, por un átomo terminal del nucleótido alternativo tal como PNA.

- 5 El separador no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen  $-(CH_2)_n-(CH_2)_nN-$ ,  $-(CH_2)_nO-$ ,  $-(CH_2)_nS-$ ,  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ , azúcares básicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oximina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida, y morfolino, y también reactivos de biotina y reactivos de fluoresceína. En las fórmulas anteriores, n es un entero positivo, y n = 3 o es preferible 6.
- 10 Otros ejemplos de la molécula que se va a añadir al extremo incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), agentes de reticulación (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), transportadores lipófilos (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O (hexadecil)glicerol, un grupo geraniolixihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)cólico, dimetoxitritilo, para fenoxazina), complejos peptídicos (por ejemplo, péptido de Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores del transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), y ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, grupos de imidazoles, complejos de acridina-imidazol, complejos Eu<sup>3+</sup> de tetraazamacrociclos).

En la molécula de ssNc de la presente invención, el extremo 5' puede estar modificado por ejemplo con un grupo fosfato o un análogo del grupo fosfato. Los ejemplos del grupo fosfato incluyen:

- 25 5'-monofosfato((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-5');  
 5'-difosfato((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');  
 5'-trifosfato(HO)<sub>2</sub>(O)P-O-(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');  
 30 caperuza de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada, 7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');  
 caperuza de 5'-adenosina (App);  
 cualquier estructura en caperuza de nucleótido modificado o no modificado (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');  
 35 5'-monotiofosfato (fosfortioato: (HO)<sub>2</sub>(S)P-O-5');  
 5'-monoditiofosfato (fosforditioato: (HO)(HS)(S)P-O-5');  
 5'-fosfortiolato ((HO)<sub>2</sub>(O)P-S-5');  
 monofosfatos, difosfatos, y trifosfatos de azufre sustituidos (por ejemplo, 5'-α-tiotrifosfato, 5'-γ-tiotrifosfato, y similares);  
 40 5'-fosforamidatos ((HO)<sub>2</sub>(O)P-NH-5'; (HO)(NH<sub>2</sub>(O)P-O-5');  
 5'-alquilfosfonatos (por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5', (OH)<sub>2</sub>(O)P-5'-CH<sub>2</sub>, donde R es alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, propilo, o similares)); y  
 5'-alquileterfosfonatos (por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5', donde R es alquileter (por ejemplo, metoximetilo, etoximetilo, o similares)).

- 45 En el resto nucleótido, la base no está particularmente limitada. La base puede ser una base natural o una base no natural, por ejemplo. La base puede ser una base derivada naturalmente o una base sintética, por ejemplo. Como base, se puede usar una base común (universal), o por ejemplo uno de sus análogos modificado, y similares.

- Los ejemplos de las bases incluyen: bases de purina tales como adenina y guanina; y bases de pirimidina tales como citosina, uracilo, y timina. Otros ejemplos de bases incluyen inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, y tubercidina. Los ejemplos de bases incluyen también: derivados de alquilo tales como 2-aminoadenina, purina 6 metilada, y purina 2 propilada; 5-halouracilo y 5-halocitosina; 5-propinil uracilo y 5-propinil citosina; 6-azo uracilo, 6-azo citosina, y 6-azo timina; 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-amino alil uracilo; 8-halogenado, aminado, tiolado, tioalquilado, hidroxilado, y otras purinas 8-sustituidas; pirimidinas 5-trifluorometiladas y otras pirimidinas 5 sustituidas; 7-metilguanina; pirimidinas 5 sustituidas; 6-azapirimidinas; N-2, N-6, y purinas O-6 sustituidas (incluyendo 2-aminopropiladenina); 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; dihidrouracilo; 3-deaza-5-azacitosina; 2-aminopurina; 5-alquiluracilo; 7-alquilguanina; 5-alquilocitosina; 7-deazaadenina; N6,N6-dimetiladenina; 2,6-diaminopurina; 5-amino-alil-uracilo; N3-metiluracilo; 1,2,4-triazoles sustituidos; 2-piridinona; 5-nitroindol; 3-nitropirrol; 5-metoxiuracilo; ácido uracil-5-oxiacético; 5-metoxicarbonilmetiluracilo; 5-metil-2-tiouracilo; 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo; 5-metilaminometil-2-tiouracilo; 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo; 3-metilcitosina; 5-metilcitosina; N4-acetilcitosina; 2-tiocitosina; N6-metiladenina; N6-isopentiladenina; 2-metil-2-tiouracilo; N-metilguanina; y bases O-alquiladas. Los ejemplos de purinas y pirimidinas incluyen las descritas en la patente de los EE.UU. N° 3.687.808, "Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", pp. 858 a 859, editada por Kroschwitz J. I, John Wiley & Sons, 1990, y Englisch et al, Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, vol. 30, p. 613.

65

Otros ejemplos del resto nucleótido modificado incluyen aquellos que no tienen bases es decir, aquellos que tienen una estructura ribofosfato abásica. Además, como restos nucleótidos modificados, se pueden usar por ejemplo los descritos en la Solicitud Provisional de los EE.UU. 60/465.665 (fecha del archivo: 25 de abril de, 2003) y Solicitud Internacional WO 2004/080406 (fecha del archivo: 8 de marzo de 2004).

### 3. Resto sin nucleótidos

El resto no nucleótido no está particularmente limitado. La molécula de ssNc de la presente invención puede incluir, como resto sin nucleótidos, una estructura sin nucleótidos que contiene por ejemplo un esqueleto de pirrolidina o un esqueleto de piperidina.

El esqueleto de pirrolidina puede ser por ejemplo la estructura de un derivado de pirrolidina obtenido mediante sustitución de al menos un carbono que constituye el anillo de 5 miembros de la pirrolidina, por ejemplo. En el caso de sustitución, es preferible por ejemplo sustituir el(los) carbono(s) diferente(s) de C-2 por ejemplo. El carbono puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno, o azufre, por ejemplo. El esqueleto de pirrolidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo de 5 miembros de la pirrolidina. En el esqueleto de pirrolidina, cada uno de los átomos de carbono y de nitrógeno que constituyen el anillo de 5 miembros de la pirrolidina puede tener un grupo hidrógeno unido a los anteriores, o un sustituyente que se va a describir a continuación unido a los anteriores, por ejemplo. Los ejemplos del esqueleto de pirrolidina incluyen estructuras de prolina y estructuras de prolinol. Las estructuras de prolina, las estructuras de prolinol, y similares son de seguridad excelente porque son sustancias presentes en organismos vivos y sus reductores, por ejemplo.

El esqueleto de piperidina puede ser por ejemplo la estructura de un derivado de piperidina obtenido mediante sustitución de al menos un carbono que constituye el anillo de 6 miembros de la piperidina. En el caso de sustitución, es preferible por ejemplo sustituir el(los) carbono(s) diferente(s) de C-2 por ejemplo. El carbono puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno, o azufre, por ejemplo. El esqueleto de piperidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo de 6 miembros de la piperidina. En el esqueleto de piperidina, los carbonos y el nitrógeno que constituyen el anillo de 6 miembros de la piperidina pueden tener cada uno un grupo hidrógeno unido a los anteriores, o un sustituyente que se va a describir a continuación unido a los anteriores, por ejemplo.

### 4. Método de síntesis de la molécula de ssNc de la presente invención

El método para sintetizar la molécula de ssNc de la presente invención no está particularmente limitado, y se puede emplear un método convencionalmente conocido. Los ejemplos del método incluyen los métodos de síntesis de acuerdo con los procedimientos de ingeniería genética y los métodos de síntesis química. Los ejemplos de los procedimientos de ingeniería genética incluyen: métodos de síntesis que utilizan la transcripción in vitro; los métodos que utilizan un vector; y los métodos llevados a cabo utilizando un casete de PCR. El vector no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen vectores no víricos tales como plásmidos, y vectores víricos. Los métodos de síntesis química no están particularmente limitados, y sus ejemplos incluyen un método de la fosforamidita y un método del H-fosfonato. Los métodos de síntesis química pueden llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un sintetizador de ácido nucleico automatizado comercialmente disponible. En los métodos de síntesis química se usa generalmente una amidita. La amidita no está particularmente limitada. Los ejemplos de amiditas comercialmente disponibles incluyen ARN Fosforamiditas (2'-O-TBDMSi, nombre comercial: Samchully Pharm. Co., Ltd.), amidita ACE, amidita TOM, amidita CEE, amidita CEM, y amidita TEM.

### 5. Composición

La composición inhibidora de acuerdo con la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una composición para inhibir la expresión de un gen diana, que contiene la molécula de ssNc de la presente invención. La composición de la presente invención se caracteriza por que contiene la molécula de ssNc de la presente invención, y otras configuraciones no son limitantes en forma alguna. La composición inhibidora de la presente invención se puede denominar también un reactivo inhibidor, por ejemplo.

Si se administra la composición a un sujeto donde el gen diana está presente, es posible inhibir la expresión del gen diana.

Además, como se ha descrito anteriormente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene la molécula de ssNc de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención se caracteriza por que contiene la molécula de ssNc de la presente invención, y otras configuraciones no son limitantes en forma alguna. La composición farmacéutica de la presente invención puede denominarse también por ejemplo sustancia farmacéutica.

Cuando se administra la composición farmacéutica a un paciente con una enfermedad producida por un gen, es posible inhibir la expresión del gen, tratando por tanto la enfermedad. El término "tratamiento" abarca: la prevención de enfermedades; la mejoría de las enfermedades; y la mejora del pronóstico, por ejemplo, y puede significar cualquiera

de ellos.

Una enfermedad que se va a tratar no está particularmente limitada, y sus ejemplos incluyen las enfermedades producidas por la expresión de genes. Dependiendo del tipo de enfermedad, un gen que produce la enfermedad puede configurarse como el gen diana, y además, dependiendo del gen diana, la secuencia inhibidora de la expresión puede configurarse como la adecuada.

Un ejemplo específico es como sigue. Si se configura el gen TGF- $\beta$ 1 como el gen diana e incorpora una secuencia inhibidora de la expresión para este gen en la molécula de ssNc, la molécula de ssNc puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente, lesiones pulmonares agudas y similares, por ejemplo.

El método de utilizar la composición inhibidora y la composición farmacéutica (a partir de ahora en el presente documento, ambas composiciones sencillamente se denominan "las composiciones") no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen administrar la molécula de ssNc a un sujeto que tiene el gen diana.

Los ejemplos del sujeto al cual se administra la molécula de ssNc de la presente invención incluyen células, tejidos, y órganos. Los ejemplos del sujeto incluyen también seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede llevarse a cabo in vivo o in vitro, por ejemplo. Las células no están particularmente limitadas, y sus ejemplos incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3, y células COS; citoblastos tales como citoblastos ES y citoblastos hematopoyéticos; y células aisladas a partir de organismos vivos, tales como células primarias cultivadas.

El método de administración no está particularmente limitado, y puede determinarse según sea adecuado dependiendo del sujeto, por ejemplo. Cuando el sujeto es una célula cultivada, el método de administración puede ser por ejemplo un método que utiliza un reactivo de transfección, un método de electroporación, o similares.

Cada una de las composiciones de la presente invención puede contener solo la molécula de ssNc de la presente invención o puede contener además un(os) aditivo(s) además de la molécula de ssNc, por ejemplo. El aditivo no está particularmente limitado, y preferentemente es, por ejemplo, un aditivo farmacéuticamente aceptable. El tipo de aditivo no está particularmente limitado, y se puede seleccionar según sea adecuado dependiendo del tipo de sujeto, por ejemplo.

En la composición de la presente invención, la molécula de ssNc puede formar por ejemplo un complejo con el aditivo. El aditivo puede denominarse también por ejemplo agente complejante. La formación del complejo permite por ejemplo a la molécula de ssNc administrarse eficazmente. El enlace entre la molécula de ssNc y el agente complejante no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen el enlace no covalente. El complejo puede ser por ejemplo un complejo de inclusión.

El agente complejante no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen polímeros, ciclodextrinas, y adamantina. Los ejemplos de ciclodextrinas incluyen copolímeros de ciclodextrinas lineales y copolímeros lineales de ciclodextrinas oxidadas.

Otros ejemplos de aditivos incluyen transportadores, sustancias de unión que se unen a una célula diana, un agente de condensación, un agente fusogénico, y un excipiente.

El vehículo preferentemente es un polímero, más preferentemente por ejemplo un biopolímero. Preferentemente, el transportador es por ejemplo biodegradable. Los ejemplos del transportador incluyen: proteínas tales como albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), y globulina; hidratos de carbono tales como, por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosán, inulina, ciclodextrina, y ácido hialurónico; y lípidos. Como transportador, se puede utilizar por ejemplo un polímero sintético tal como un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), poliácido L-aspartico, poliácido L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido maleico, copolímero de poli(L-lactido-co-glicólido), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímero de N-isopropilacrilamida, y polifosfazina.

Los ejemplos de la sustancia de unión incluyen la hormona estimuladora del tiroides, hormona estimuladora de los melanocitos, lectinas, glucoproteínas, proteína A tensioactiva, el hidrato de carbono mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonatos, ácido poliglutámico, ácido poliaspartico, lípidos, colesterol, esteroides, ácidos biliares, folato, vitamina B12, biotina, neproxina, péptido RGD, y un mimético del péptido RGD.

Los ejemplos del agente fusogénico y del agente de condensación incluyen cadenas de poliamino tales como polietilenimina (PEI). PEI puede ser tanto lineal como ramificada, y también, puede producirse por ejemplo tanto sintética como naturalmente. La PEI puede estar sustituida por ejemplo con un alquilo o un lípido. Como agente fusogénico, es también posible por ejemplo utilizar polihistidina, poliimidazol, polipiridina, polipropilenimina, melitina,

una sustancia poliactal (por ejemplo, un poliactal catiónico o similar), o similares. El agente fusogénico puede tener por ejemplo una estructura en hélice  $\alpha$ . El agente fusogénico puede ser por ejemplo un agente perturbador de membrana tal como melitina.

5 Como composiciones de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe la formación del complejo y similares en la patente de los EE.UU. N° 6.509.323, Publicación de patente de los EE.UU. N° 2003/0008818 y documento WO 2004 080406 (solicitud Internacional N° PCT/US04/07070).

10 Otros ejemplos del aditivo incluyen moléculas anfifílicas. La molécula anfifílica es por ejemplo una molécula que tiene una región hidrófoba y una región hidrófila. La molécula es preferentemente por ejemplo un polímero. El polímero puede tener, por ejemplo, una estructura secundaria, preferentemente una estructura secundaria de repetición. Específicamente, es preferible un polipéptido, y son más preferibles por ejemplo un polipéptido con una hélice  $\alpha$  y similares.

15 El polímero anfifílico puede ser por ejemplo un polímero que tiene dos o más subunidades anfifílicas. Los ejemplos de la subunidad incluyen subunidades con una estructura cíclica que tiene al menos un grupo hidrófilo y un grupo hidrófobo. La subunidad puede contener un esteroide tal como ácido cólico, una estructura aromática, y similares, por ejemplo. El polímero puede contener, por ejemplo, una subunidad de estructura cíclica, tal como una subunidad aromática, y un aminoácido.

## 20 6. Método inhibidor

La expresión de un gen diana puede estar inhibida cuando se usa la molécula de ssNc de la presente invención. El método de efectuar dicha inhibición se caracteriza por que la molécula de ssNc de la presente invención se usa en el anterior, y otras etapas y condiciones lo son sin limitación de medios.

25 El mecanismo por el cual se inhibe la expresión génica no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen la inhibición de la expresión por la interferencia del ARN o un fenómeno similar a la interferencia del ARN. El método inhibidor es, por ejemplo, un método para inducir la interferencia del ARN que inhibe la expresión de un gen diana, y este se puede referir también a un método inhibidor que se caracteriza por que la molécula de ssNc de la presente invención se usa en el anterior.

30 El método inhibidor incluye por ejemplo la etapa de administrar la molécula de ssNc a un sujeto donde está presente el gen diana. Mediante la etapa de administración, la molécula de ssNc se pone en contacto por ejemplo con el sujeto al cual se administra la molécula de ssNc. De acuerdo con el método in vitro de la invención, la molécula de ssNc se administra a las células, tejidos, y órganos. Los ejemplos del sujeto incluyen también seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede llevarse a cabo in vivo o in vitro, por ejemplo.

40 En el método inhibidor, la molécula de ssNc puede administrarse sola, o se puede administrar la composición de la presente invención que contiene, por ejemplo, la molécula de ssNc. El método de administración no está particularmente limitado, y se puede seleccionar según sea adecuado dependiendo del tipo de sujeto, por ejemplo.

## 45 7. Método de tratamiento

Una enfermedad puede tratarse mediante un método que incluye la etapa de administrar la molécula de ssNc de la presente invención a un paciente, y la molécula de ssNc incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que produce la enfermedad. El método de tratamiento se caracteriza por que la molécula de ssNc de la presente invención se usa como se indica anteriormente, y otras etapas y condiciones lo son sin limitación de medios.

50 La descripción relativa al método inhibidor se aplica también por ejemplo al método de tratamiento. El método de administración no está particularmente limitado, y puede ser tanto mediante administración oral como mediante administración parenteral, por ejemplo.

## 55 8. Uso de la molécula de ssNc

La molécula de ssNc de la presente invención se usa para inhibir la expresión de un gen diana. Asimismo, la molécula de ssNc de la presente invención se usa para inducir la interferencia del ARN.

60 La molécula de ARN de acuerdo con la presente invención es una molécula de ARN para su uso en el tratamiento de una enfermedad. La molécula de ARN es la molécula de ssNc de la presente invención, y la molécula de ssNc incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que produce la enfermedad.

65

En lo sucesivo, la presente invención se describirá detalladamente con referencia a los ejemplos y similares. Debe señalarse, sin embargo, la invención no se limita en forma alguna a lo anterior.

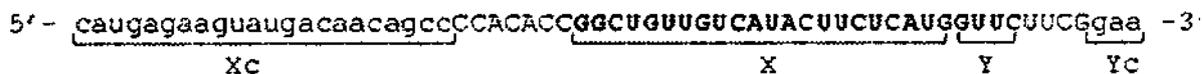
**Ejemplos**

5 (Ejemplo A1) Síntesis de ARN

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se ha sintetizado el ARNss (NK-0016) que se muestra a continuación. NK-0016 incluye una secuencia inhibidora de la expresión de 19-mer (SEC ID N°: 1) que inhibe la expresión del gen GAPDH. En la secuencia de NK-0016, la región situada entre la región (Xc) y la región (X) es una región enlazadora (Lx), y la región situada entre la región (Y) y la región (Yc) es una región enlazadora (Ly) (a partir de ahora en el presente documento la misma). En esta secuencia, la región 5' (Xc) y la región 3' (Yc) se indican con letras minúsculas (a partir de ahora en el presente documento las mismas).

La secuencia inhibidora de la expresión del gen GAPDH (SEC ID N°: 1) 5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3'

15 **Ej: NK-0016 (SEC ID N°: 2)**



Como ARN de un ejemplo comparativo, se ha sintetizado el ARNds (NI-0011) que se muestra a continuación como control positivo del ARNi (Pc). NI-0011 tiene un saliente de dos bases en el extremo 3' de cada cadena única, y la cadena única de la SEC ID N°: 4 tiene la secuencia inhibidora de la expresión de 19 meros anteriormente descrita, de manera similar a NK-0016.

Pc: NI-0011

25 **5' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAG-3' (SEC ID N°: 3)**  
**3' - UUGGUACUCUUCAUACUGUUG -5' (SEC ID N°: 4)**

Se sintetizaron los ARN basándose en el método de la fosforamidita con el uso de un sintetizador de ácido nucleico (nombre comercial: ABI Expedite (marca registrada) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems). En la síntesis, ARN Fosforamiditas (2'-O-TBDMSi, nombre comercial: Samchully Pharm. Co., Ltd.), se utilizaron como amiditas ARN (lo mismo aplica a partir de ahora en el presente documento). Las amiditas se desprotegeron mediante un método convencional. Los ARN sintetizados se purificaron mediante HPLC. Cada uno de los ARN purificados se liofilizaron. En los ejemplos siguientes, se llevó a cabo la síntesis de los ARN de la misma manera que en el presente ejemplo, salvo que se indique de otra forma.

El ARN liofilizado se disolvió en agua destilada para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., a partir de ahora en el presente documento la misma) para conseguir las concentraciones deseadas.

(Ejemplo A2) Efecto inhibidor sobre la expresión del gen GAPDH en células HCT116

Usando el ARNss de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH in vitro.

(1) Materiales y Métodos

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usó el ARNss (NK-0016) del Ejemplo A1.

**Ej: NK-0016 (SEC ID N°: 2)**



Las soluciones del ARN se prepararon disolviendo el ARN en agua destilada para inyección a fin de conseguir las concentraciones deseadas. Se usaron células HCT116 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.), como células. Se usó un medio FBS al 10% que contenía McCoy 5A (Invitrogen) como medio. Las condiciones de cultivo se ajustaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

En primer lugar, las células HCT116 se cultivaron en el medio, y se dispensaron a una placa de 24 pocillos de tal manera que cada pocillo contenía 400 µl del medio para alcanzar una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo. Las células de los pocillos se cultivaron durante 24 horas más. A continuación, las células se transfectaron con el ARN utilizando un reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (nombre comercial, Invitrogen) de acuerdo con el protocolo suministrado con el anterior. Específicamente, la transfección se llevó a cabo ajustando la composición por pocillo de la siguiente forma. La concentración final del ARN en el pocillo se ajustó a 5 nmol/l, 10 nmol/l, 20 nmol/l, o 40 nmol/l.

[Tabla 1]

(Composición por pocillo:  $\mu$ l)

Medio	400
(A) Lipofectamine 2000	1,5
(B) Opti-MEM (Invitrogen)	98
(C) solución de ARN	0,5
Total	500

Tras la transfección, las células de los pocillos se cultivaron durante 48 horas, y después, el ARN se recogió utilizando un RNeasy Mini Kit (nombre comercial, Qiagen) de acuerdo con el protocolo suministrado con el anterior. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN utilizando una transcriptasa inversa (nombre comercial: Superscript III, Invitrogen) de acuerdo con el protocolo suministrado con el anterior. Después, se llevó a cabo la PCR utilizando como molde el ADNc sintetizado de esta manera, y se midieron el nivel de expresión del gen GAPDH y el del gen de la  $\beta$ -actina como un patrón interno. Se corrigió el nivel de expresión del gen GAPDH con referencia al gen de la  $\beta$ -actina.

Se llevó a cabo la PCR utilizando un LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (nombre comercial, Roche) como reactivo y un Light Cycler DX400 (nombre comercial, Roche) como instrumento (a partir de ahora en el presente documento el mismo). El gen GAPDH y el gen de la  $\beta$ -actina se amplificaron utilizando los siguientes conjuntos de cebadores, respectivamente.

Conjunto de cebador para el gen GAPDH

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (SEC ID N°: 9)

5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (SEC ID N°: 10)

Conjunto de cebador para el gen de la  $\beta$ -actina

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (SEC ID N°: 11)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3' (SEC ID N°: 12)

Como Control 1, con respecto a las células a las cuales se habían añadido solamente 100  $\mu$ l de (B), se midieron también los niveles de expresión de los genes (-). Además, como Control 2, con respecto a las células sometidas a los mismos procedimientos de transfección que en el anterior excepto que no se añadió solución de ARN y que se añadieron (B) y 1,5  $\mu$ l de (A) de tal manera que la cantidad total de (A) y (B) fuera de 100  $\mu$ l, se midió también el nivel de expresión del gen (simulado).

Después, se ajustó el nivel de expresión corregido del gen GAPDH en el control (-) como 1, y el de las células transfectadas con ARN a cada concentración se presentó como el valor relativo en el control (-).

## (2) Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 4. La Fig. 4 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH. Como se puede observar en la FIG. 4, cuando se usó NK-0016, la cantidad de expresión fue más pequeña que en el control (-) al que no se añadió ARN. De esta manera, se ha encontrado que NK-0016 inhibe la expresión del gen GAPDH. Asimismo, como se puede observar en la FIG. 4, se ha encontrado que NK-0016 presenta un efecto inhibitor de una manera dependiente de la dosis.

(Ejemplo A3) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen GAPDH en células HCT116

Usando el ARNss de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH in vitro.

### (1) Materiales y Métodos

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usó el ARNss (NK-0016) del Ejemplo A1. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usó el ARNds (NI-0011) como control positivo del ARNi (Pc). Se preparó la solución de ARN disolviendo cada uno de los ARN en agua destilada para inyección con el fin de conseguir una concentración de 40  $\mu$ mol/l.

Se examinó el nivel de expresión del gen GAPDH en las células HCT 116 de la misma manera que en el Ejemplo A2, excepto que se usó la solución de ARN anterior. La concentración de ARN en el momento de la transfección se ajustó a 40 nmol/l.





Conjunto de cebador para el gen TGF- $\beta$ 1

5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3' (SEC ID N°: 17)  
5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3' (SEC ID N°: 18)

5

Conjunto de cebador para la amplificación del gen de la  $\beta$ -actina

5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3' (SEC ID N°: 19)  
5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3' (SEC ID N°: 20)

10

Con respecto a cada uno del control (-) y del control (simulado), se midió el nivel de expresión de la misma manera que en el Ejemplo A2. El nivel de expresión corregido del gen TGF- $\beta$ 1 en el control (-) se ajustó como 1, y el de las células transfectadas con cada ARN se presentó como el valor relativo en el control.

15 (2) Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 8. La Fig. 8 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen TGF- $\beta$ 1. Como se puede observar en la FIG. 8, NK-0033 de acuerdo con el ejemplo inhibió la expresión del gen TGF- $\beta$ 1 in vitro. Por otra parte, NK-0035 como control negativo no inhibe la expresión del gen TGF- $\beta$ 1.

20

(Ejemplo A6) Efectos inhibidores sobre la expresión del gen TGF- $\beta$ 1 y la lesión grave de pulmón in vivo

25

Con respecto al ARNss de la presente invención, se examinaron los efectos inhibidores sobre la expresión y la lesión grave de pulmón in vivo. Estos efectos se examinaron de acuerdo con el método descrito en Takagi et al. (J. Thromb Hemost 2009; 7: pp. 2053-2063).

(1) Materiales y Métodos

30

(1.1) Administración de ARNss a ratones con lesión grave de pulmón

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usó el ARNss (NK-0033) del Ejemplo A5. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usó el ARNss (NK-0035) como el control negativo del ARNi (Nc) que se muestra en el ejemplo A5.

35

Se preparó la solución de ARN disolviendo 100  $\mu$ g de cada uno de los ARNss en 80  $\mu$ l de solución salina fisiológica estéril (Nippon Kayaku Co., Ltd., a partir de ahora en el presente documento la misma). Por otra parte, se preparó una solución de LPS disolviendo 100  $\mu$ g de lipopolisacárido (LPS) en 50  $\mu$ l de solución salina fisiológica estéril.

40

En primer lugar, 80  $\mu$ l de la solución de ARN se instilaron en las tráqueas de los ratones. Después, 1 hora después de la instilación, 50  $\mu$ l de la solución de LPS se instilaron en las tráqueas de los ratones para inducir la lesión de pulmón.

Como control negativo para la LPS, 50  $\mu$ l de solución salina fisiológica estéril que no contenía LPS se usaron en vez de la solución de LPS. Asimismo, como control para la solución de ARN, se usaron 80  $\mu$ l de solución salina fisiológica estéril.

45

Se muestran a continuación los grupos de administración. En cada grupo de administración, se utilizaron de cuatro a seis ratones.

Grupo 1 de administración:

50

1 hora después de la administración de 80  $\mu$ l de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50  $\mu$ l de la solución salina fisiológica estéril. Grupo 2 de administración:

1 hora después de la administración de 80  $\mu$ l de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50  $\mu$ l de la solución salina fisiológica estéril. Grupo 3 de administración:

55

1 hora después de la administración de 80  $\mu$ l de la solución de ARN (NK-0035), se administraron 50  $\mu$ l de la solución salina fisiológica estéril. Grupo 4 de administración:

1 hora después de la administración de 80  $\mu$ l de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50  $\mu$ l de la solución de LPS.

60

Grupo 5 de administración:

1 hora después de la administración de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50  $\mu$ l de la solución de LPS.

65

Grupo 6 de administración:

1 hora después de la administración de la solución de ARN (NK-0035), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

#### (1.2) Muestreo de fluido de lavado bronquioalveolar (BALF)

24 horas después de la instilación de la solución de LPS, los ratones se sometieron a eutanasia mediante la administración de pentobarbital en exceso a sus cavidades abdominales, y se utilizaron como muestras para el análisis bioquímico y el análisis histológico. Como control negativo se usó solución salina fisiológica estéril en vez de la solución de LPS.

Se recogieron muestras de sangre mediante punción de los corazones de los ratones. Se añadió cada muestra de sangre a un tubo de ensayo que contenía una solución acuosa al 3,8% de citrato de sodio. La cantidad (volumen) de la solución acuosa de citrato de sodio se ajustó a 1/10 de la muestra de sangre. Se recogió una muestra de BALF de esta mezcla de la manera descrita en Yasui et al. (Am J Respir Crit Care Med 2001: 163: 1660-8). Después, se midió el número total de células en la muestra de BALF utilizando un Nucleo Counter (nombre comercial, ChemoMetec).

Se centrifugó la muestra de BALF, y se recogió el sobrenadante de la muestra de BALF. El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta que se realizó el análisis bioquímico. Además, a fin de contar los diferentes tipos de células contenidos en la muestra de BALF, la muestra de BALF se centrifugó usando un Cytospin, y las células separadas se sometieron a la tinción Giemsa usando un May-Grunwald-Giemsa (nombre comercial, Merck). Asimismo, se recogieron tejidos pulmonares de los ratones y a continuación se tñieron con HE.

#### (2) Resultados

##### (2.1) Inhibición de la expresión de TGF-β1 en pulmón

Con respecto a cada muestra de pulmón de los ratones, se midió el nivel de expresión del gen TGF-β1 por unidad de peso de pulmón utilizando un TGF-β1 Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA (nombre comercial, R&D Systems).

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 9. La Fig. 9 es una gráfica que muestra el nivel de expresión de TGF-β1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración. En el grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)), se aumentó el nivel de expresión de TGF-β1 como resultado del tratamiento con LPS, en comparación con el grupo 1 de administración (LPS (-)/ARN(-)). En el grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un aumento en el nivel de expresión de TGF-β1 en comparación con el del grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). No se observó este efecto inhibitor en el grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que NK-0033 del ejemplo puede inhibir eficazmente la expresión del gen TGF-β1.

##### (2.2) Efecto inhibitor sobre la lesión grave de pulmón

La inflamación en la lesión grave de pulmón está producida por la infiltración de células tales como neutrófilos en los pulmones. De esta manera, se pueden usar fármacos que inhiban la infiltración de células tales como neutrófilos en los pulmones como agentes terapéuticos para la inflamación en la lesión grave de pulmón. De esta manera, se examinó el efecto farmacológico del ARNss de la presente invención mediante el recuento del número de células en fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) como un indicador del número de células que tienen infiltrados los pulmones.

Los resultados del recuento del número de células en la muestra de BALF se muestran en la FIG. 10. La Fig. 10 es una gráfica que muestra el número de células en una muestra de BALF en cada grupo de administración. En el grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)), el número de células en la muestra de BALF aumentó como resultado del tratamiento con LPS, en comparación con el del grupo 1 de administración (LPS (-)/ARN(-)). Esto indica que LPS indujo una acción inflamatoria, por lo cual se permitió que las células se infiltraran en los pulmones. En el grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un aumento en el número de células en comparación con el del grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). Esto indica que la inflamación en la lesión grave de pulmón fue inhibida porNK-0033. No se observó este efecto inhibitor en el grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que NK-0033 del ejemplo puede inhibir eficazmente la inflamación en la lesión grave de pulmón eficazmente.

Los resultados de medir el número de neutrófilos en la muestra de BALF se muestran en la FIG. 11. La Fig. 11 es una gráfica que muestra el número de neutrófilos en la muestra de BALF en cada grupo de administración. En el grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)), el número de neutrófilos en la muestra de BALF aumentó como resultado del tratamiento con LPS, en comparación con el del grupo 1 de administración (LPS (-)/ARN(-)). Esto indica que LPS indujo una acción inflamatoria, por lo cual se permitió que los neutrófilos se infiltraran en los pulmones. En el grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un aumento en el número de neutrófilos en la muestra de BALF en comparación con el del grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). Esto indica que la inflamación en la

lesión grave de pulmón fue inhibida porNK-0033. No se observó este efecto inhibitor en el grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que NK-0033 del ejemplo puede inhibir eficazmente la inflamación en la lesión grave de pulmón eficazmente.

5 (2.3) Observación histológica: Tinción Giemsa

Los resultados de la tinción Giemsa se muestran en la FIG. 12. La Fig. 12 muestra fotografías (x 100), que muestran cada una de ellas el resultado de la tinción Giemsa de las células en la muestra de BALF. La Fig. 12A muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). La Fig. 12B muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Fig. 12C muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033(+)).

Como se puede observar en la FIG. 12, en el grupo 5 de administración (FIG. 12C: LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, el número de células infiltradas en los pulmones fue marcadamente menor que las del grupo 4 de administración (FIG. 12A: LPS (+)/ARN(-)) y el grupo 6 de administración (FIG. 12B: LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Los resultados de esta observación histológica están de acuerdo con los resultados del recuento del número de células en la muestra de BALF descrita anteriormente.

20 (2.4) Observación histológica: Tinción HE

Los resultados de la tinción HE se muestran en la FIG. 13. La Fig. 13 muestra fotografías (x 10) mostrando cada una el resultado de la tinción HE del tejido pulmonar. La Fig. 13A muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 4 de administración (LPS (+)/ARN(-)). La Fig. 13B muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 6 de administración (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Fig. 13C muestra el resultado obtenido con respecto al grupo 5 de administración (LPS (+)/NK-0033(+)) con respecto a la FIG 13, se ha encontrado que la infiltración de las células tales como neutrófilos en la proximidad de vasos sanguíneos, espacios alveolares, paredes alveolares, y la proximidad de tubos bronquiales disminuyó y los daños a los tejidos pulmonares disminuyeron.

30 (Ejemplo 7) Evaluación del efecto secundario utilizando la inducción del interferón como indicador

Se sabe que los agentes del ARNi convencionales dan como resultado un efecto secundario de tal manera que se indujo el interferón de una manera independiente de la secuencia, y este efecto secundario se ha percibido como un problema. De esta manera, con respecto al ARNss de la presente invención, se ha evaluado la inducción del interferón como efecto secundario.

35 (1) Materiales y Métodos

Se administró ARNss a ratones con lesión grave de pulmón de la misma manera y bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo A6. Después, 24 horas después de la instilación de la solución de LPS o la solución salina fisiológica estéril (control negativo para LPS), los ratones se sometieron a eutanasia, y se recogieron sus tejidos pulmonares.

[Tabla 4]

Grupo de administración	ARN	LPS
1	-	-
2	Ej: NK-0033	-
4	-	+
5	Ej: NK-0033	+
EJ: ARN del ejemplo		

45 Para medir el nivel de expresión de cada gen, se aisló el ARN de cada uno de los tejidos pulmonares usando TRIZOL (nombre comercial, Invitrogen). A continuación, se sintetizó el ADNc a partir del ARN utilizando una transcriptasa inversa (nombre comercial: SuperScriptII, Invitrogen) de acuerdo con el protocolo suministrado con el anterior. Después, se llevó a cabo la PCR utilizando como molde el ADNc sintetizado de esta manera, y se midieron los niveles de expresión del gen TGF-β1, el gen IFN-α, y el gen IFN-β.

50 Se llevó a cabo la PCR utilizando Gold AmpliTaq (nombre comercial, Applied Biosystems, EE.UU.) como reactivo y un AB Applied Biosystem 7600 (nombre comercial, Applied Biosystem) como instrumento de medida. El gen TGF-β1, el gen IFN-α, y el gen IFN-β se amplificaron utilizando los siguientes conjuntos de cebadores, respectivamente.

Conjunto de cebador para el gen GAPDH

5'-CCCTTATTGACCTCAACTACATGGT-3' (SEC ID N°: 21)  
5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (SEC ID N°: 22)

Conjunto de cebador para el gen TGF- $\beta$ 1

5'-ACTCCACGTGGAAATCAAGGG-3' (SEC ID N°: 23)  
5'-TAGTAGACGATGGGCAGTGG-3' (SEC ID N°: 24)

Conjunto de cebadores para el gen IFN- $\alpha$

5'-ATGGCTAGRCTCTGTGCTTCCT-3' (SEC ID N°: 25)  
5'-AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3' (SEC ID N°: 26)

Conjunto de cebadores para el gen IFN- $\beta$

5'-CATCAACTATAAGCAGCTCCA-3' (SEC ID N°: 27)  
5'-TTCAAGTGGAGAGCAGTTCAG-3' (SEC ID N°: 28)

Después, cada uno de los productos de la PCR obtenidos de esta manera se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se llevó a cabo el análisis de densidad del gel de agarosa utilizando un sistema de diagnóstico por imágenes NIH, y se midieron los niveles de expresión de los respectivos genes. Se evaluaron los niveles de expresión del gen TGF- $\beta$ 1, el gen IFN- $\alpha$ , y el gen IFN- $\beta$  relativamente con referencia el nivel de expresión del gen GAPDH como el patrón. Específicamente, la intensidad medida del producto de la PCR obtenido utilizando el conjunto de cebadores para GAPDH, se ajustó como 1, y se evaluaron los genes respectivos como valor relativo al de GAPDH.

## (2) Resultados y consideraciones

Los resultados del análisis cuantitativo con respecto a los niveles de expresión del gen TGF- $\beta$ 1, el gen IFN- $\alpha$ , y el gen IFN- $\beta$  se muestran en las gráficas de las FIG. 14A a 14C, respectivamente. Los grupos de administración son como se muestran a continuación y son iguales que en el Ejemplo A6.

La Fig. 14A muestra los resultados de medir el nivel de expresión del gen TGF- $\beta$ 1. Como se puede observar en la FIG. 14A, en el grupo 5 de administración del ejemplo al que se administró NK-0033, se inhibió un aumento en la expresión del gen TGF- $\beta$ 1 inducido por LPS, en comparación con el del grupo 4 de administración (ARN(-)). Este resultado se correlaciona con los resultados de medir el nivel de expresión de TGF- $\beta$ 1 en el Ejemplo A5, que se muestran en la FIG. 8.

La Fig. 14B muestra los resultados de medir el nivel de expresión del gen IFN- $\alpha$ , y la Fig. 14C muestra los resultados de medir el nivel de expresión del gen IFN- $\beta$ . Como se puede observar en las FIGS. 14B y 14C, cuando no se instiló LPS, se ha encontrado a partir de la comparación entre el grupo 1 de administración (ARN (-)) y el grupo 2 de administración (ARN (+)) que las expresiones del gen IFN- $\alpha$  y el gen IFN- $\beta$ , que son ambos interferón de tipo I, no se indujeron mediante la instilación del ARNs. Asimismo, como se puede observar en las FIG. 14B y 14C, cuando no se instiló LPS, se ha revelado a partir de la comparación entre el grupo 4 de administración (ARN (-)) y el grupo 5 de administración (NK-0033 (+)) que las expresiones del gen IFN- $\alpha$  y el gen IFN- $\beta$  no se indujeron por la instilación del ARNs.

Estos resultados contrastan con el hecho de que el uso de ARNip convencionales produce un efecto secundario que se indujo mediante el Interferón de tipo I. Es decir, se ha demostrado que, de forma inesperada, el ARNs de la presente invención no produce inducción del interferón como el efecto secundario que se ha percibido como un problema en los ARNip convencionales.

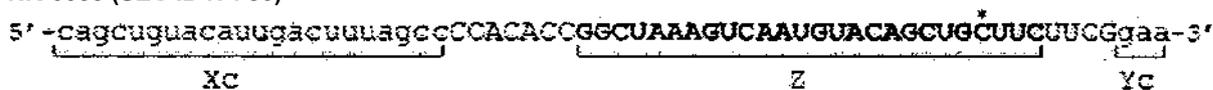
(Ejemplo A8) Efecto inhibitor en la expresión del gen TGF- $\beta$ 1 en células Hepa1-6

Con respecto al ARNs de la presente invención, se examinó el efecto inhibitor sobre la expresión del gen TGF- $\beta$ 1 in vitro.

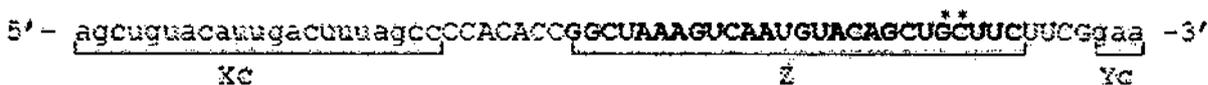
## (1) Materiales y Métodos

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usaron el NK-0033 del Ejemplo A5 y el NK-0061, NK-0055, y NK-0062 que se muestran a continuación. En las siguientes secuencias, "\*" indica una base desemparejada.

Ej: NK-0033 (SEC ID N°: 80)



Ej: NK-0061 (SEC ID N°: 29)



Ej: NK-0055 (SEC ID N°: 30)



Ej: NK-0062 (SEC ID N°: 31)



Asimismo, como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron PK-0007, PK-0026, PK-0027, y PK-0028 que se muestran a continuación. En cada uno de estos ARNss, se proporcionaron una región enlazadora (Lx) y una región enlazadora (Ly) por el compuesto 10 de unión (L-prolina-diamida-amidita) en el Esquema 3 que se muestra en los Ejemplos B entre Xc y X, y entre Yc en Y, respectivamente.

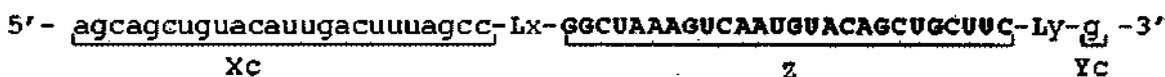
Ej: NK-0007 (SEC ID N°: 32)



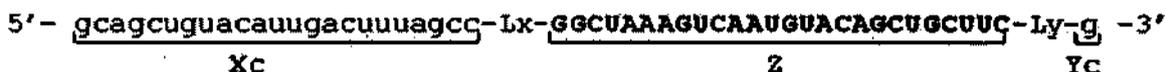
Ej: PK-0026 (SEC ID N°: 33)



Ej: PK-0027 (SEC ID N°: 34)



Ej: PK-0028 (SEC ID N°: 35)



Las secuencias de NK-0033, NK-0061, NK-0055 y NK-0062 son iguales que las de PK-0007, PK-0026, PK-0027 y PK-0028, respectivamente, excepto para el primer enlazador (L1) y el segundo enlazador (L2). Todos tienen una secuencia que inhibe la expresión del gen TGF-β1 (SEC ID N°: 16).

(1.2) Inhibición de la expresión génica

Se preparó la solución de ARN disolviendo cada uno de los ARN que se habían crioconservado en agua destilada para inyección con el fin de conseguir una concentración de 20 μmol/l. Después, se llevaron a cabo la transfección del ARNss a las células Hepa 1-6, la recogida del ARN, la síntesis del ADNc, PCR, y la determinación del nivel de expresión relativa del gen TGF-β1 de la misma manera que en el Ejemplo A5, excepto que se usó la solución de ARN anterior. La concentración de ARN en el momento de la transfección se ajustó a 1 nmol/l.



ratones.

Grupo 1 de administración:

5 5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50 µl de la solución salina fisiológica estéril. Grupo 2 de administración:  
5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50 µl de la solución de LPS.

10 Grupo 3 de administración:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (PK-0007), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

15 Grupo 4 de administración:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (PK-0008), se administraron 50 µl de la solución de LPS. Grupo 5 de administración:

20 5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo 6 de administración:

25 5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (N-0035), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo 7 de administración:

30 5 minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (NI-0030), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo 8 de administración:

35 5 minutos después de la administración de 50 µl de la solución de ARN (NI-0031), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Después, se prepararon las muestras de pulmón y se midió el nivel de expresión de TGF-β1 por unidad de peso de pulmón de la misma manera que en el Ejemplo A6.

40 Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 17. La Fig. 17 es una gráfica que muestra el nivel de expresión por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración. En el grupo 3 de administración (LPS (+)/PK-0007 (+)) y el grupo 5 de administración (LPS (+)/N-0033 (+)), el nivel de expresión del gen TGF-β1 se inhibió en comparación con el del grupo 2 de administración (LPS (+)/ARNss(-)). Se ha encontrado que estos efectos inhibidores fueron más fuertes que en el grupo 7 de administración (LPS (+)/control positivo NI-0030). En particular, en el grupo 3 de administración (LPS (+)/PK-0007 (-)), se observó un marcado efecto inhibitor. En los grupos de administración a los cuales se administraron los ARN del control negativo, a saber, el grupo 4 de administración (PK-0008), el grupo 6 de administración (NK-0035), y el grupo 8 de administración (NI-0031), no se observó efecto inhibitor.

50 (A9-2) Efecto fuera de especificaciones in vivo

Usando el ARNss de la presente invención, se examinó el efecto fuera de especificaciones in vivo y se evaluó el efecto secundario.

55 Como ARN del presente ejemplo se usó el ARNss (PK-0007) del Ejemplo A8. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usaron ARNss (PK-0008) como un control negativo del ARNi (Nc), ARNds (NI-0030) como control positivo del ARNi (Pc), y ARNds (NI-0031) como el control negativo del ARNi que se muestran en el Ejemplo A9-1. Se preparó la solución de ARN disolviendo 100 µg de cada uno de los ARN en 75 µl de solución salina fisiológica estéril.

60 Se muestran a continuación los grupos de administración. En cada grupo de administración, se usaron de dos a cuatro ratones.

Grupo 1 de administración:

65 se administraron 75 µl de la solución salina fisiológica estéril.





se convirtieron en moléculas que carecían de bases sin emparejar. Además, cada uno de los ARNss diferentes de NK-0036 y NK-0040 se convirtieron en moléculas cuya región interna (Z) incluye solamente una base sin emparejar que no forma una doble cadena y la posición de la base sin emparejar en la región interna (Z) cambió desde el lado 3' al lado 5'.

Se llevaron a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recogida del ARN, la síntesis del ADNc, y la PCR de la misma manera que en el Ejemplo A2, excepto que se usaron cada uno de los anteriores ARN, y se determinó el nivel de expresión relativa del gen GAPDH. La concentración de ARN en el momento de la transfección se ajustó a 10 nmol/l.

## (2) Resultados y consideraciones

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 22. La Fig. 22 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 10 nmol/l. Como se puede observar en la FIG. 22, se ha encontrado que todos los ARNss con las longitudes variadas de la región del lado 5' (Xc) y la región del lado 3' (Yc) inhibieron la expresión del gen GAPDH.

En particular, se ha descubierto que, a medida que la diferencia entre la longitud de bases de la región (Xc) y la longitud de bases de la región (Yc) aumenta, el nivel de expresión del gen disminuye relativamente, es decir, la actividad inhibitoria aumentó. Es decir, se ha descubierto que, ajustando la posición de la base sin emparejar en la región interna (Z) de tal manera que esté más cercana al lado 5' o al lado 3' con respecto a la parte intermedia de la región interna, es posible mejorar la actividad inhibitoria.

En el Ejemplo A2, se ha encontrado que NK-0016 tiene una actividad inhibitoria muy potente. En el presente ejemplo, se ha encontrado que las actividades inhibitorias de NK-0025 y NK-0037 fueron incluso superiores a las de NK-0016.

Análogamente al resultado obtenido para la posición de la base sin emparejar, se obtuvo también el mismo efecto que en el presente ejemplo en los ejemplos donde se examinaron diferentes genes, por ejemplo, Ejemplo A8 (gen TGF- $\beta$ 1), Ejemplo A10 (gen LAMA1), y Ejemplo A11 (gen LMNA).

Es decir, en el Ejemplo A8, como se muestra en las secuencias anteriores, NK-0033 y NK-0055 tienen ambos una única base sin emparejar. En NK-0033, la base sin emparejar es la 4ª base desde el extremo 3' de la región interna (Z). En NK-0055, la base sin emparejar es la 2ª base desde el extremo 3' de la región interna (Z). Después, como se puede observar en la FIG. 15 descrita anteriormente, NK-0055, que tiene la base sin emparejar en la posición más cercana al extremo 3' presentó una mayor actividad inhibitoria. Se obtuvo el mismo resultado cuando se comparan NK-0061 y NK-0062 teniendo cada uno dos bases sin emparejar. Asimismo, en los Ejemplos A9 y A10, se cambió la posición de la base sin emparejar en las mismas condiciones que en el Ejemplo A8. Como resultado, de igual forma, el ARNss que tiene la base sin emparejar en la posición más cercana al extremo 3' presentó una mayor actividad inhibitoria.

También, a partir de estos resultados, resulta evidente que el ARNss de la presente invención presenta un comportamiento similar independientemente del tipo de gen diana y la secuencia inhibitoria de la expresión para el gen diana. De esta manera, puede decirse que el ARNss de la presente invención es una herramienta que es aplicable con respecto al tipo del gen diana.

## (Ejemplo A13) longitudes de X, Xc, Y e Yc

Con respecto al ARNss de la presente invención, se cambiaron las longitudes de la región interna del lado 5' (X), la región del lado 5' (Xc), la región interna del lado 3' (Y), y la región del lado 3' (Yc), y se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH.

## (1) Materiales y Métodos

Como ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNss que se muestran en la FIG. 23. En la FIG. 23, los números de la derecha indican los números de identificación de secuencias. En la FIG. 23, desde el lado 5', la región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); la región indicada con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z); y la región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). Asimismo, "Xc+Yc/X+Y" indica la relación entre la longitud total de bases de las regiones (Xc) e (Yc) y la longitud total de bases de las regiones (X) e (Y). En la FIG. 23, "\*" indica una base desemparejada.

En cada uno de los ARNss, la longitud de bases de la región enlazadora (Lx) se ajustó a 7, la longitud de bases de la región enlazadora (Ly) se ajustó a 4, la longitud de bases de la región enlazadora (Yc) se ajustó a 1, y la 2ª base desde el extremo 3' de la región interna (Z) se ajustó para ser una base sin emparejar. Después, se cambiaron la longitud de bases de la región interna (Z) y la longitud de bases de la región (Xc).

Salvo que se indique de otra forma, se llevó a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recogida del ARN, la síntesis del ADNc, y la PCR de la misma manera que en el Ejemplo A2, y se midió el nivel de expresión relativa del

gen GAPDH. La transfección se llevó a cabo ajustando la composición por pocillo como sigue. En la siguiente composición, (B) es Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen), (C) es la solución de ARN de 20  $\mu\text{mol/l}$ , y se añadieron de tal manera que su cantidad total de sería de 98,5  $\mu\text{l}$ . La concentración final del ARN en el pocillo se ajustó a 1  $\text{nmol/l}$ . También se llevaron a cabo la corrección con un patrón interno y el cálculo de un valor relativo del nivel de expresión de la misma manera que en el Ejemplo A2.

[Tabla 5]  
(Composición por pocillo:  $\mu\text{l}$ )

Medio	400
(A) Lipofectamine 2000	1,5
(B) + (C)	98,5
Total	500

## (2) Resultados y consideraciones

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 24. La Fig. 24 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 1  $\text{nmol/l}$ . Como se puede observar en la FIG. 24, se ha encontrado que todos los ARNss con las longitudes variadas de las regiones (X), (Xc), (Y), e (Yc) inhibieron la expresión del gen GAPDH. En el Ejemplo A2, se ha encontrado que NK-0016 tiene una actividad inhibitoria muy potente. En el presente ejemplo, se ha encontrado que las actividades inhibitorias de todos los ARNss excluyendo NK-0016 fueron incluso superiores a las de NK-0016.

(Ejemplo A14) longitud de Xc

Con respecto al ARNss de la presente invención, se cambió la longitud de la región del lado 5' (Xc) complementaria a la región interna del lado 5' (X), y se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH.

## (1) Materiales y Métodos

Como ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNss que se muestran en la FIG. 25. En la FIG. 25, desde el lado 5', la región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región indicada con letras mayúsculas subrayadas es la región interna del lado 5' (X); y la región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). Asimismo, "Xc/X" indica la relación entre la longitud de bases (Xc) de la región (Xc) y la longitud de bases (X) de la región (X). En la FIG. 25, "\*" indica una base desemparejada. Se muestran las secuencias de los ARN siguientes en las SEC ID N<sup>os</sup>. 74 a 76.

En cada uno de los ARNss, la longitud de bases de la región interna (Z) se ajustó a 26; la longitud de bases de la región (X) se ajustó a 25, la longitud de bases de la región (Y) se ajustó a 1, la longitud de bases de la región enlazadora (Yc) se ajustó a 1, la longitud de bases de la región enlazadora (Lx) se ajustó a 7, y la longitud de bases de la región enlazadora (Ly) se ajustó a 4. Después, en estas condiciones, se cambió la longitud de bases de la región (Xc). De esta manera, en cada uno de los ARNss, se cambiaron la presencia o ausencia de una base sin emparejar que no forma una doble cadena y el número de dichas bases sin emparejar. NK-0001 no tiene base sin emparejar.

Se llevaron a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recogida del ARN, la síntesis del ADNc, y la PCR de la misma manera que en el Ejemplo A13, excepto que se usaron cada uno de los anteriores ARN, y se midió el nivel de expresión relativa del gen GAPDH. Se llevaron a cabo la corrección con un patrón interno, y el cálculo de un valor relativo del nivel de expresión de la misma manera que en el Ejemplo A13.

## (2) Resultados y consideraciones

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 26. La Fig. 26 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 1  $\text{nmol/l}$ . Como se puede observar en la FIG. 26, se ha encontrado que todos los ARNss con las longitudes variadas de la región del lado 5' (Xc) inhibieron la expresión del gen GAPDH. En particular, cuando los ARNss tienen base(s) sin emparejar, se considera que la actividad inhibitoria aumenta a medida que disminuye el número de bases sin emparejar. En el Ejemplo A2, se ha encontrado que NK-0016 tiene una actividad inhibitoria muy potente. En el presente ejemplo, se ha encontrado que el ARNss utilizado en el presente ejemplo, que son diferentes de NK-0016, presentaron todas actividades inhibitorias superiores incluso a las de NK-0016.

Análogamente al resultado obtenido para la las bases sin emparejar, se obtuvo también el mismo efecto que en el presente ejemplo en el Ejemplo A8 donde el gen examinado (gen TGF- $\beta$ 1) era diferente de uno en el presente ejemplo. Es decir, en el Ejemplo A8, como se muestra en las secuencias anteriores, N-0033 tiene una base sin emparejar, y NK-0061 tiene dos bases sin emparejar. Después, como se puede observar en la FIG. 15 descrita anteriormente, el NK-0033 tiene un número menor de bases sin emparejar presentó una mayor actividad inhibitoria. Además, los





## (2) Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 30. La Fig. 30 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células HCT116. Como se puede observar en la FIG. 30, los ARN derivados de ARNss que incluyen prolina como región enlazadora (Lx) y la región enlazadora (Ly) presentan una potente actividad inhibitoria y se ha encontrado que presentan la actividad inhibitoria de una manera dependiente de la concentración. Por otra parte, no se observó efecto inhibitor cuando se usaron ARNss como control negativo.

(Ejemplo A18) Resistencia a la ribonucleasa

Con respecto al ARNss de la presente invención, se examinó la resistencia a la ribonucleasa.

## (1) Materiales y Métodos

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usaron NK-0033 del Ejemplo A5 y PK-0007 del Ejemplo A8. Además, como ARN de un ejemplo comparativo, se usaron se usó el ARNds (NK-0030) como un control positivo (Pc) en el Ejemplo A9.

En primer lugar, se mezclaron 60 pmol de cada una de los anteriores ARN,  $5 \times 10^{-5}$  unidades de ARNasa A (Roche), y  $5 \times 10^{-5}$  unidades de ARNasa T1 Roche) con 20 mmol/l de Tris-HCl (pH 8), y la mezcla resultante se incubó a 37°C. 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos después del inicio de la incubación, la reacción de las ARNasas se terminó de acuerdo con un método convencional. Después, la solución de la reacción se sometió a electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida al 15%. A continuación, el gel se tiñó con Verde SYBR II (Lonza, Suiza) y a continuación se analizó utilizando un E-BOX-VX2 (M & S Instruments Inc., Tokio).

## (2) Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 31. La Fig. 31 es un electroferograma que muestra la resistencia a la ribonucleasa. En la FIG. 31, la hilera "M" indica un marcador de pesos moleculares, y "min" indica el tiempo de incubación.

Como se puede observar en la FIG. 31, el NI-0030 del ejemplo comparativo se degradó casi completamente después de 10 minutos de incubación. Por el contrario, NK-0033 y PK-0007 del ejemplo permanecieron todavía incluso después de 10 minutos de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNss de la presente invención es superior al ARNds en la resistencia a la ribonucleasa.

(Ejemplo A19) Resistencia a la nucleasa

Con respecto al ARNss de la presente invención, se examinó la resistencia a la nucleasa.

## (1) Materiales y Métodos

Se usaron los mismos ARN que en el Ejemplo A18. En primer lugar, se mezclaron 60 pmol de cada ARN y 0,5 unidades de nucleasa S7 (Roche) con 50 mol/l de Tris-HCl (pH8) que contenía 5 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$ , y la mezcla resultante se incubó a 37°C. 0,5 minutos después del inicio de la incubación (0 h), se finalizó la reacción de la nucleasa S7 de acuerdo con un método convencional. Después, la solución de la reacción se sometió a electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida urea al 15% 7M de acuerdo con un método convencional. A continuación, el gel se tiñó con Verde SYBR II (nombre comercial, Lonza) y a continuación se analizó usando un E-BOX-VX2 (nombre comercial, M & S Instruments Inc.).

## (2) Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 32. La Fig. 32 es un electroferograma que muestra la resistencia a la nucleasa S7. En la FIG. 32, la hilera "M" indica un marcador de pesos moleculares, y "h" indica el tiempo de incubación.

Como se puede observar en la FIG. 32, el NI-0030 del ejemplo comparativo se degradó casi completamente después de 0,5 horas de incubación. Por el contrario, los NK-0033 y PK-0007 del ejemplo permanecieron todavía incluso después de 0,5 horas de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNss de la presente invención es superior al ARNds en la resistencia a la nucleasa S7.

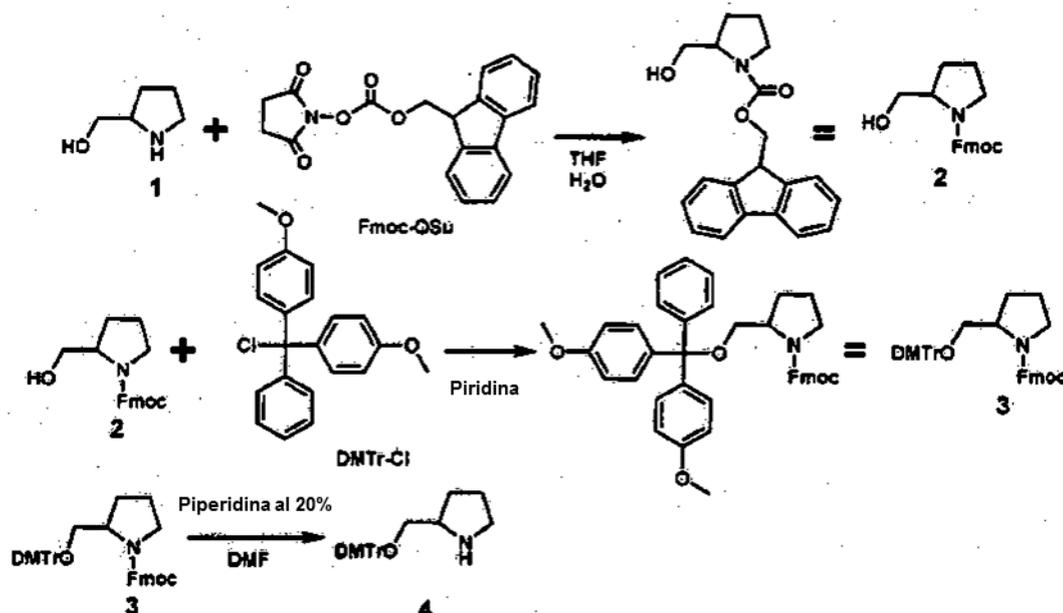
Con respecto a los resultados respectivos obtenidos en los Ejemplos A, se ha encontrado que el ARNss de la presente invención puede construirse con respecto al tipo de un gen diana, por ejemplo. Específicamente, se ha descubierto que, en el ARNss, es posible modificar la longitud de una doble cadena formada por las regiones (X) y (Xc) y la longitud de una doble cadena formada por las regiones (Y) e (Yc); la presencia o ausencia de una base sin emparejar que no forma una doble cadena en la región interna (Z), el número y la posición de dichas bases sin emparejar; la presencia o

ausencia de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly), el tipo y la longitud de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly); y similares, por ejemplo. De esta manera, puede decirse que el ARNss de la presente invención es una novedosa herramienta versátil que se puede usar para inhibir la expresión de un gen diana sin depender del tipo del gen diana.

## 5 (Ejemplo B1)

## 1. Síntesis del prolinol

De acuerdo con el Esquema 1 mostrado a continuación, se sintetizó el prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo.



10

Esquema 1

## (1) Fmoc-L-prolinol (Compuesto 2)

15 L-prolinol (Compuesto 1) (0,61 g, 6,0 mmol) se disolvió en 70 ml de agua pura, preparando de esta forma una solución acuosa de L-prolinol. Se disolvió N-(9-Fluorenilmetoxicarbonilo) succinimida (Fmoc-OSu) (2,0 g, 6,0 mmol) en 10 ml de THF. Esta solución de THF se añadió a la solución acuosa de L-prolinol, y esto se agitó durante 1 hora de forma que reaccionaran el L-prolinol y el Fmoc-OSu. La solución de reacción se separó en una fracción líquida y una fracción de precipitado. Estas fracciones se sometieron respectivamente a extracción con acetato de etilo, y las respectivas capas orgánicas se recogieron. Las capas orgánicas así obtenidas se mezclaron, y se añadió sulfato de sodio para absorber la humedad (a partir de ahora en el presente documento, este proceso se denomina como proceso de "secado"). Las capas orgánicas se filtraron, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: hexano: acetato de etilo = 1 : 1). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 2 (1,4 g, rendimiento: 74%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

25 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,77 (2H, d, J = 7,7 Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, J = 7,3 Hz, Ar-H), 7,40 (2H, t, J = 7,5 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, t, J = 7,6 Hz, Ar-H), 4,40-4,50 (2H, m, COOCH<sub>2</sub>), 4,22 (1H, t, J = 6,5 Hz, Ar-CH), 3,20-3,80 (5H, m, H-5, H-6), 1,75 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

## 30 (2) Fmoc-DMTr-L-prolinol (Compuesto 3)

El Fmoc-L-prolinol (Compuesto 2) (1,4 g, 4,3 mmol) se disolvió en 20 ml de piridina y se sometió a destilación azeotrópica por tres veces. La sustancia residual obtenida se disolvió en 20 ml de piridina. Durante la agitación de esta solución en un baño de hielo bajo atmósfera de argón, y se añadió cloruro de 4,4-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (1,8 g, 5,3 mmol). La reacción de esta solución de reacción se siguió mediante TLC usando cloroformo/metanol, y la reacción se dejó continuar durante 4 horas hasta que se dejó de observar la mancha del Fmoc-L-prolinol. Para inactivar el exceso de DMTr-Cl, se añadieron 3 ml de metanol a la solución de reacción, y esta se agitó durante 10 minutos. Se añadió más cloroformo a la solución de reacción, y a continuación, se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con una solución saturada de salmuera, después se lavó con una solución acuosa de hidrogenocarbonato sódico al 5%, y de nuevo con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica así lavada se secó con sulfato de sodio anhidro. Después, la capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo, piridinina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 3 (2,0 g, rendimiento: 74%). Se muestra a continuación el

40

resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,77 (2H, d,  $J = 7,7$  Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d,  $J = 7,3$  Hz, Ar-H), 7,40-7,18 (13H, m, Ar-H), 6,89 (4H, d,  $J = 8,6$  Hz, Ar-H), 4,20-4,40 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 4,02 (1H, t,  $J = 6,5$  Hz, Ar-CH), 3,80-3,10 (5H, m, H-5, H-6), 3,73 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,58 (1H, m, H-3).

5

(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 4)

10

El Fmoc-DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (2,0 g, 3,2 mmol) se disolvió en 25 ml de una solución de DMF que contenía un 20% de piperidina, y esta se agitó durante 12 horas. La solución se concentró al vacío, y la sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo-metanol = 85 : 15, que contenía piridina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 4 (1,0 g, rendimiento: 78%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

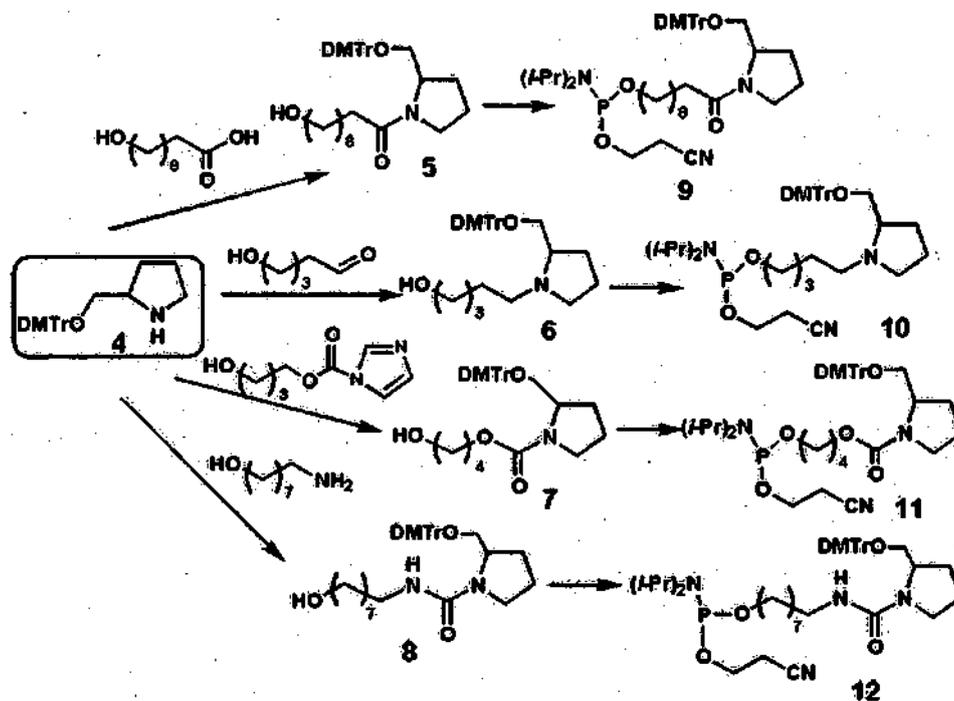
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d,  $J = 8,6$  Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3,31 (1H, m, H-6), 3,07 (2H, m, H-2, H-6), 2,90 (2H, m, H-5), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

15

2. Síntesis de derivados de amidita

20

A continuación, de acuerdo con el Esquema 2 mostrado a continuación, se sintetizaron derivados de amidita que tienen prolinol. A partir de ahora en el presente documento, el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida se denomina "EDC", y la N,N-dimetilaminopiridina (4-dimetilaminopiridina) se denomina "DMAP".



Esquema 2

25

(1) DMTr-amida-L-prolinol (Compuesto 5)

30

El DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmol), EDC (0,46 g, 2,4 mmol), y DMAP (0,29 g, 2,4 mmol) se disolvieron en 20 ml de diclorometano, y esto se agitó a continuación. Se añadió ácido 10-hidroxidecanoico (0,45 g, 2,4 mmol) a esta solución, y esto se agitó a continuación. La reacción de esta solución de reacción se siguió mediante TLC con acetato de etilo, y la reacción se dejó continuar durante 20 horas hasta que se dejó de observar la mancha del DMTr-L-prolinol. Después, se añadió diclorometano a la solución de reacción, y después se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con una solución saturada de salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo, que contenía piridina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 5 (0,71 g, rendimiento: 62%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

35

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d,  $J = 8,6$  Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3,68-2,93 (7H, m, H-2, H-5, H-6), 2,27-1,72 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alquilo), 1,30 (10H, s, alquilo).

## (2) DMTr-alquil-L-prolinol (Compuesto 6)

El DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmol) se disolvió en 15 ml de metanol. Se añadió 5-hidroxibenzotriazol (0,31 g, 3,0 mmol) a lo anterior, y esto se agitó a continuación. Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,25 g, 4,0 mmol) a esta solución, que se agitó adicionalmente. La reacción de esta solución de reacción se siguió mediante TLC con acetato de etilo/hexano, y la reacción se dejó continuar durante 24 horas hasta que se dejó de observar la mancha del DMTr-L-prolinol. Se añadió acetato de etilo a la solución de reacción, y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con una solución saturada de salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo= 1: 1, que contenía piridina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 6 (0,62 g, rendimiento: 63%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,70-2,86 (4H, m, CH<sub>2</sub>OH, H-6), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,45-1,27 (4H, m, alquilo).

## (3) DMTr-uretano-L-prolinol (Compuesto 7)

Se disolvió 1,4-butano diol (0,90 g, 10 mmol) en 30 ml de diclorometano. Se añadió carbonil diimidazol (1,4 g, 8,6 mmol) adicionalmente a lo anterior, y esta se agitó durante 3 horas. La capa orgánica de esta solución de reacción se lavó con una solución saturada de salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 9 : 1). De esta manera, se obtuvo un compuesto donde un extremo del 1,4-butano diol estaba activado con carbonildiimidazol (0,25 g, 1,5 mmol). Este compuesto se disolvió en 15 ml de diclorometano. Se añadió el DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,6 g, 1,5 mmol) a lo anterior, y esta se agitó durante 24 horas. Se añadió más cantidad de acetato de etilo a esta mezcla, y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con una solución saturada de salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo= 1: 1, que contenía piridina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 7 (0,61 g, rendimiento: 77%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (8H, m, alquilo, H-3, H-4).

## (4) DMTr-ureido-L-prolinol (Compuesto 8)

El DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,50 g, 1,2 mmol) y trifosgeno (0,12 g, 0,40 mmol) se disolvieron en 8 ml de diclorometano, y la mezcla resultante se agitó en un baño de hielo bajo atmósfera de argón. N, N-diisopropiletilamina (0,31 g, 2,4 mmol) a la solución, y esta se agitó durante 1 hora. Después, se añadió 8-amino-1-propanol (0,17 g, 1,2 mmol) adicionalmente a lo anterior, y se agitó durante 30 minutos en un baño de hielo de la misma forma que se ha indicado anteriormente. Después, se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió diclorometano a esta solución, y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con una solución saturada de salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo= 4: 1, que contenía trietilamina al 1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 8 (0,44 g, rendimiento: 62%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,68-3,25 (9H, m, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>OH, H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

## (5) Derivados de amidita que tienen prolinol (Compuestos 9 a 12)

Los compuestos 9 a 12 se sintetizaron de la siguiente forma usando los prolinoles modificados (Compuestos 5 a 8), respectivamente, como materias primas. Cada uno de los prolinoles modificados y 5-benciltio-1H-tetrazol se disolvieron en 3 ml de acetonitrilo. La cantidad del prolinol modificado utilizada fue la siguiente: Compuesto 5: 0,69 g (1,2 mmol); Compuesto 6: 0,60 g (1,2 mmol); Compuesto 7: 0,60 g (1,2 mmol); y Compuesto 8: 0,25 g (0,43 mmol). La cantidad del 5-benciltio-1H-tetrazol utilizada fue la siguiente: 0,15 g (0,78 mmol) para los Compuestos 5 a 7; y 54 mg (0,15 mmol) para el Compuesto 8. Bajo atmósfera de argón, se añadió a la solución 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil fosfordiamidita, y esta se agitó durante 2 horas. La cantidad de 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil fosfordiamidita añadida fue: 0,54 g (1,8 mmol) en los sistemas de reacción que utilizan los Compuestos 5 a 7; y 0,19 g (0,64 mmol) en el sistema de reacción que utiliza el Compuesto 8. Después, se añadió a la solución una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la capa orgánica se extrajo con diclorometano y se recogió. La capa orgánica recogida se secó con sulfato sódico anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo= 1: 1, que contenía trietilamina al 1%). De esta manera, se obtuvieron los Compuestos 9 a 12. Se muestran a continuación los resultados del análisis mediante RMN relativos a estos compuestos.

DMTr-amida-L-prolinol amidita (Compuesto 9, 0,60 g, rendimiento: 55%) RMN <sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,68-2,93 (11H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,27-1,72 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alquilo), 1,30 (22H, s, alquilo, CHCH<sub>3</sub>).

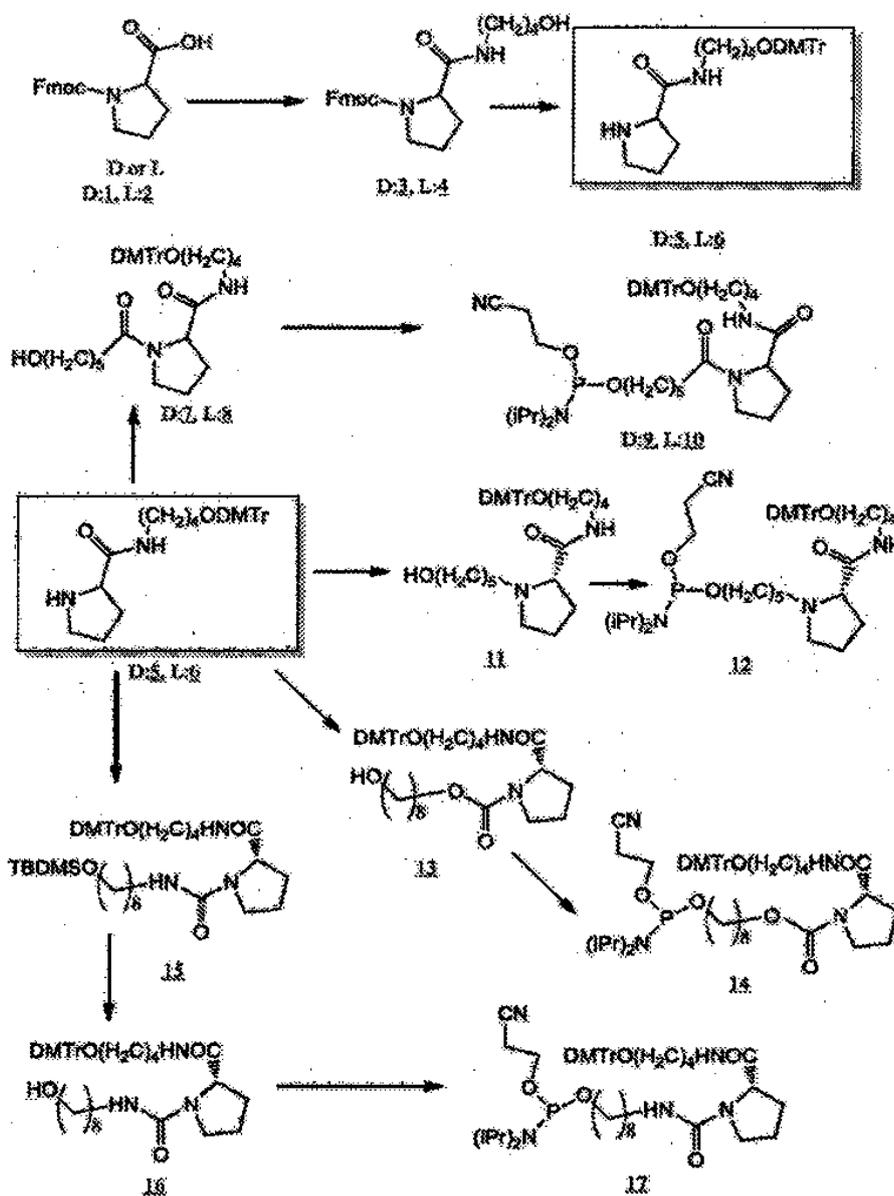
5 DMTr-alquil-L-prolinol amidita (Compuesto 10, 0,71 g, rendimiento: 60%) RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,70-2,86 (8H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-6), 2,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,37-1,10 (16H, m, alquilo, CHCH<sub>3</sub>).

10 DMTr-uretano-L-prolinol amidita (Compuesto 11, 0,67 g, rendimiento: 52%) RMN <sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,72-2,96 (11H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,10-1,46 (8H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH<sub>3</sub>).

15 DMTr-ureido-L-prolinol amidita (Compuesto 12, 0,20 g, rendimiento: 61%) RMN <sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,65-3,25 (13H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH<sub>3</sub>).

(Ejemplo B2)

20 A continuación, de acuerdo con el Esquema 3 mostrado a continuación, se sintetizaron derivados de amidita que tienen L-prolina.



Esquema 3

## (1) DMTr-hidroxiamida amino-L-prolina (Compuesto 11)

Se añadió un tampón de ácido acético (7 ml) a una solución de etanol (7 ml) que contenía DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol) y 5-hidroxipentalanal (0,33 g, 3,07 mmol) bajo enfriamiento de hielo. La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos con enfriamiento de hielo. A continuación, se añadió cianobromohidruro de sodio (0,77 g, 12,28 mmol) adicionalmente a lo anterior, y se agitó durante 7 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano, se lavó con agua, y a continuación se lavó adicionalmente con una solución saturada de salmuera. Después, la capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró, y el disolvente del filtrado resultante se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 98 : 2, que contenía piridina al 0,05%). Después, el producto obtenido se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 98 : 2, que contenía piridina al 0,05%), y el producto obtenido se aplicó adicionalmente a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano acetona = 7 : 3, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 11 en forma de un jarabe (0,49 g, rendimiento: 41%). EM (BAR+): m/z 575 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>)

## (2) DMTr-amida amino-L-prolina amidada (Compuesto 12).

La DMTr-hidroxiamida amino-L-prolina (Compuesto 11) así obtenida (0,50 g, 0,87 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida diisopropilamonio (178 mg, 1,04 mmol). La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (313 mg, 1,04 mmol). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando sílice como relleno (eluyente hexano : acetona = 7 : 3, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 12 en forma de un jarabe (0,57 g, pureza: 93%, rendimiento: 79%). La pureza se midió mediante HPLC (a partir de ahora en el presente documento el mismo). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 1H), 3,79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,47-3,64 (m, 3H), 3,12-3,26 (m, 2H), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,98-2,02 (m, 2H), 2,61 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,55-2,63 (m, 2H), 2,27-2,42 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,40-1,90 (m, 8H), 1,23-1,33 (m, 5H), 1,14-1,20 (m, 12H, CH<sub>3</sub>); RMN P (CDCl<sub>3</sub>): δ 146,91; EM (BAR+): m/z 774 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>).

## (3) DMTr-hidroxiamida carbamoil-L-prolina (Compuesto 13)

A una solución de acetonitrilo anhidro (10 ml) donde se había disuelto DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol) se añadió una solución de acetonitrilo anhidro (20 ml) donde se había disuelto 1-imidazo carboniloxi-8-hidroxiocetano (1,12 g, 4,92 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Esta mezcla se calentó de 40°C a 50°C durante 2 días, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 días. El disolvente de la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 4 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 13 en forma de un jarabe (0,68 g, rendimiento: 50%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,23-4,30 (m, 1H), 4,05-4,10 (m, 2H), 3,79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,60-3,65 (m, 2H), 3,32-3,55 (m, 2H), 3,16-3,29 (m, 2H), 3,01-3,07 (m, 2H), 2,38-2,40 (m, 1H, CH), 1,83-1,90 (m, 2H), 1,57-1,69 (m, 8H), 1,26-1,36 (m, 2H); EM (BAR+): m/z 602 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

## (4) DMTr-amida carbamoil-L-prolina amidada (Compuesto 14)

La DMTr-hidroxiamida carbamoil-L-prolina (Compuesto 13) así obtenida (0,63 g, 1,00 mmol) se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. Se añadió tetrazolida diisopropilamonio (206 mg, 1,20 mmol) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (282 mg, 1,12 mmol). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando sílice como relleno (eluyente hexano : acetona = 7 : 3, que contenía piridina al 0,5%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 14 en forma de un jarabe (0,74 g, pureza: 100%, rendimiento: 87%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN P (CDCl<sub>3</sub>): δ 147,19;  
EM (BAR+): m/z 860 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>).

(5) DMTr-t-butil dimetil siloxi amida ureido-L-prolina (Compuesto 15)

Se añadió una solución de tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a trifosgeno (1,22 g, 4,10 mmol) con enfriamiento de hielo en una atmósfera de argón. Una solución de tetrahidrofurano anhidro (10 ml) donde se había disuelto DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol) y DIEA (9,80 g, 75,8 mmol) se instiló en dicha mezcla con enfriamiento de hielo en una atmósfera de argón durante 30 minutos. A continuación, se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una solución de tetrahidrofurano anhidro (20 ml) donde se había disuelto 10-amino-1-t-butil dimetil siloxidecano (2,66 g, 10,25 mmol) y DIEA (3,20 g, 24,76 mmol) se instiló en la mezcla con enfriamiento de hielo en una atmósfera de argón durante 45 minutos. Después, la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Esta mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 ml), y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica se lavó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio y a continuación se lavó adicionalmente con una solución saturada de salmuera. Después, la capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró, y el disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 4 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 15 en forma de un jarabe (0,87 g, rendimiento: 55%).

(6) DMTr-hidroxiamida ureido-L-prolina (16)

A la DMTr-t-butil dimetil siloxi amida ureido-L-prolina (15) así obtenida (0,87 g, 1,12 mmol), se añadió una solución de tetrahidrofurano anhidro en diclorometano (10 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A esta mezcla se añadió una solución de tetrahidrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (4,69 ml, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) y esta mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano (150 ml), y se lavó con agua y a continuación se lavó adicionalmente con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 1 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 16 en forma de un jarabe (0,68 g, rendimiento: 92%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,19-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,34 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,63 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,61 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,34-3,37 (m, 1H, CH), 3,16-3,27 (m, 5H), 3,04 (t, J = 5,9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 1,83-2,05 (m, 3H), 1,45-1,64 (m, 8H), 1,25-1,38 (m, 7H).

(7) DMTr-amida ureido-L-prolina amidita (Compuesto 17)

La DMTr-hidroxiamida ureido-L-prolina (Compuesto 16) así obtenida (0,62 g, 0,94 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. Se añadió tetrazolida diisopropilamonio (192 mg, 1,12 mmol) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (282 mg, 1,12 mmol) en acetonitrilo anhidro. Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando sílice como relleno (eluyente hexano : acetona = 1 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 17 en forma de un jarabe (0,77 g, pureza: 88%, rendimiento: 84%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN P (CDCl<sub>3</sub>): δ 147,27;  
EM (BAR+): m/z 860 (M<sup>+</sup>+1), 303 (DMTr<sup>+</sup>), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>).

(Ejemplo B3) Síntesis de prolina-diamida-amidita

Para producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluya un enlazador con una estructura principal de prolina, se sintetizaron L-prolina-diamida-amidita y D-prolina-diamida-amidita de acuerdo con el Esquema 3.

(B3-1) L-prolina-diamida-amidita

(1) Fmoc-hidroxiamida-L-prolina (Compuesto 4)

El Compuesto 2 (Fmoc-L-prolina) del Esquema 3 se utilizó como material de partida. El Compuesto 2 (10,00 g, 29,64 mmol), 4-amino-1-propanol (3,18 g, 35,56 mmol), y 1-hidroxibenzotriazol (10,90 g, 70,72 mmol) se mezclaron

entre sí. La mezcla se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (140 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y se añadió una solución en acetonitrilo anhidro (70 ml) de dicitclohexilcarbodiimida (7,34 g, 35,56 mmol) adicionalmente a lo anterior. A continuación, esta mezcla se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Tras finalizar la reacción, el precipitado generado se eliminó por filtración, y el disolvente del filtrado recogido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió diclorometano (200 ml) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 ml). Después, la capa orgánica se recogió y secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró, y el disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió dietil éter (200 ml) a la sustancia residual, convirtiendo de esta forma la sustancia residual en un polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 4 en forma de un polvo incoloro (10,34 g, rendimiento: 84%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,76-7,83 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,33 (m, 2H, Ar-H), 4,40-4,46 (m, 1H, CH), 4,15-4,31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,67-3,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,35-3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,18-3,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,20-2,50 (m, 4H), 1,81-2,03 (m, 3H), 1,47-1,54 (m, 2H);  
EM (BAR+): m/z 409 (M+H<sup>+</sup>).

#### (2) DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6)

La Fmoc-hidroxi-amida-L-prolina (Compuesto 4) (7,80 g, 19,09 mmol) se mezcló con piridina anhidra (5 ml), y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente dos veces. A la sustancia residual obtenida 4, se añadieron cloruro de 4-dimetoxitriilo (8,20 g, 24,20 mmol), DMAP (23 mg, 0,19 mmol), y piridina anhidra (39 ml). Esta mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió metanol (7,8 ml) a lo anterior, y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml), y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (150 ml). A continuación, se separó la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, y después se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadieron dimetilformamida anhidra (39 ml) y piperidina (18,7 ml, 189 mmol) a la sustancia residual purificada así obtenida, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras finalizar la reacción, el disolvente de la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (nombre comercial: Wakogel C-300, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 9 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 6 en forma de un aceite de color amarillo claro (9,11 g, rendimiento: 98%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,30 (d, J = 8,8 Hz, 4H, Ar-H), 7,21 (tt, 1H, 4,9, 1,3 Hz, Ar-H), 6,81 (d, J = 8,8 Hz, 4H, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,71 (dd, H, J = 6,3 Hz, 5,4 Hz, CH), 3,21 (2H, 12,9, 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,05 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,85-2,91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,85-2,00 (m, 3H), 1,55-1,65 (m, 5H);  
EM (BAR+): m/z 489 (M+H<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

#### (3) DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina (Compuesto 8)

Se preparó una solución de diclorometano anhidro mezclando la DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (6,01 g, 12,28 mmol), EDC (2,83 g, 14,74 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (3,98 g, 29,47 mmol), y trietilamina (4,47 g, 44,21 mmol) en diclorometano anhidro (120 ml). Se añadió ácido 6-hidroxi-decanoico (1,95 g, 14,47 mmol) adicionalmente a esta solución a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y después se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano (600 ml), y se lavó tres veces con una solución saturada de salmuera (800 ml). Después se recogió la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, y después se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 8 en forma de una espuma de color amarillo claro (6,29 g, rendimiento: 85%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,61 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,50-3,55 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,15-3,24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,04 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,05-2,20 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,48-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);  
EM (BAR+): m/z 602 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

#### (4) DMTr-diamida-L-prolina amidita (Compuesto 10)

La DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina (Compuesto 8) así obtenida (8,55 g, 14,18 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente tres veces. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida diisopropilamonio (2,91 g, 17,02 mmol). La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (10 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución (7 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (5,13 g, 17,02 mmol) en acetonitrilo anhidro. Esta mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con agua y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 ml) tres veces y después con una solución saturada de salmuera (200 ml). La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A

continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando sílice como relleno (eluyente hexano : acetato de etilo = 1 : 3, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 10 en forma de un jarabe (10,25 g, pureza: 92%, rendimiento: 83%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 4H), 3,79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,45-3,60 (m, 4H), 3,35-3,45 (m, 1H, CH), 3,20-3,29 (m, 1H), 3,04 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,62 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,40-2,44 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,92-2,02 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,16 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); RMN P (CDCl<sub>3</sub>): EM δ 147,17; EM (BAR+): m/z 802 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>). (B3-2) D-prolina-diamida-amidita

#### 15 (1) Fmoc-hidroxi-amida-D-prolina (Compuesto 3)

El Compuesto 1 (Fmoc-D-prolina) del Esquema 3 se utilizó como material de partida. La mezcla del Compuesto 1 (1,5 g, 4,45 mmol), diciclohexilcarbodiimida (1,1 g, 5,34 mmol), y 1-hidroxibenzotriazol (1,5 g, 10,69 mmol) se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (24 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y se añadió una solución en acetonitrilo anhidro (6 ml) de 4-amino-1-butanol (0,48 g, 5,34 mmol) adicionalmente a lo anterior. A continuación, esta mezcla se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Tras finalizar la reacción, el precipitado generado se eliminó por filtración, y el disolvente del filtrado recogido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió diclorometano a la sustancia residual obtenida, y la mezcla se lavó con tampón de ácido acético (pH 4,0) y se lavó adicionalmente con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio por tres veces. Después, la capa orgánica se recogió y secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró, y el disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió dietil éter (50 ml) a la sustancia residual, convirtiendo de esta forma la sustancia residual en un polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 3 en forma de un polvo de color blanco. Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,77 (d, J = 7,3 Hz, 2H); 7,58 (a, 2H); 7,41 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 7,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 4,25-4,43 (m, 4H); 3,25-3,61 (m, 6H); 1,57-1,92 (m, 8H). EM (BAR+): m/z 409 (M+H<sup>+</sup>).

#### 35 (2) DMTr-amida-D-prolina (Compuesto 5)

La Fmoc-hidroxi-amida-D-prolina (Compuesto 3) (1,0 g, 2,45 mmol) se mezcló con piridina anhidra (5 ml), y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente dos veces. A la sustancia residual obtenida 4, se añadieron cloruro de 4-dimetoxitritilo (1,05 g, 3,10 mmol), DMAP (3 mg, 0,024 mmol), y piridina anhidra (5 ml). Esta mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió metanol (1 ml) a lo anterior, y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. A continuación, se separó la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, y después se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadieron dimetilformamida anhidra (5 ml) y piperidina (2,4 ml, 24 mmol) a la sustancia residual purificada así obtenida, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras finalizar la reacción, el disolvente de la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (nombre comercial Wakogel C-300, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 9 : 1, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 5 en forma de un aceite de color amarillo claro (1,26 g, rendimiento: 96%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,62 (a, 1H); 7,41-7,44 (m, 2H); 7,26-7,33 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,80-6,84 (m, 4H); 3,78 (s, 6H); 3,71 (dd, J = 8,8, 5,4 Hz, 1H); 3,22 (c, 6,5 Hz, 2H); 3,07 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 2,97-3,03 (m, 1H); 2,85-2,91 (m, 1H); 1,85-2,15 (m, 3H); 1,55-1,73 (m, 6H). MS (ESI): m/z = 489 (M+H), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

#### 55 (3) DMTr-hidroxi-diamida-D-prolina (Compuesto 7)

Se preparó una solución de diclorometano anhidro mezclando la DMTr-amida-D-prolina (Compuesto 5) (1,2 g, 2,45 mmol), EDC (566 mg, 2,95 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (796 mg, 5,89 mmol), y trietilamina (1,2 ml, 8,84 mmol) en diclorometano anhidro (24 ml). Se añadió ácido 6-hidroxi-decanoico (390 mg, 2,95 mmol) adicionalmente a esta solución a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y después se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio tres veces. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 7 en forma de un aceite de color amarillo claro (1,4 g, rendimiento: 95%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,79-6,83 (m, 4H); 3,79 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 2H); 3,49-3,55 (m, 1H); 3,15-3,26 (m, 2H); 3,02-3,07 (m, 2H); 2,30-2,33 (m, 2H); 2,11-2,20 (m, 1H); 1,50-1,99 (m, 13H); 1,36-1,43 (m, 2H).  
EM (BAR<sup>+</sup>): m/z 602 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

5

(4) DMTr-diamida-D-prolina amidita (Compuesto 9)

La DMTr-hidroxi-diamida-D-prolina (Compuesto 7) así obtenida (1,2 g, 1,99 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente tres veces. Se añadió tetrazolida diisopropilamonio (410 mg, 2,40 mmol) a la sustancia residual obtenida. La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (2,4 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (722 mg, 2,40 mmol). Esta mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio tres veces y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando sílice como relleno (eluyente hexano : acetato de etilo = 1 : 3). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 9 en forma de un aceite incoloro (1,4 g, pureza: 95 %, rendimiento: 83%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

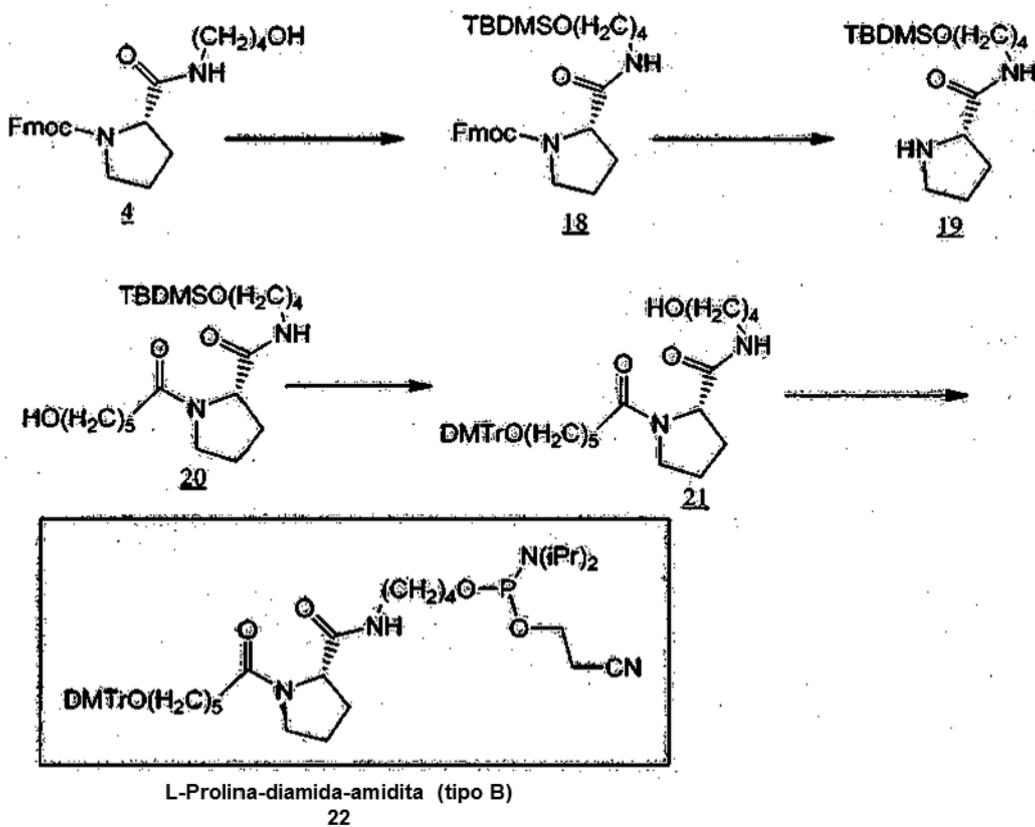
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,14-7,21 (m, 1H); 6,80-6,83 (m, 4H); 3,80-3,85 (m, 2H); 3,79 (s, 6H); 3,49-3,65 (m, 5H); 3,02-3,06 (m, 2H); 2,60-2,63 (m, 2H); 2,29-2,33 (m, 2H); 1,77-1,82 (m, 2H); 1,56-1,68 (m, 8H); 1,38-1,43 (m, 2H); 1,15-1,29 (m, 18H).  
RMN <sup>31</sup>P (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 146,94.  
EM (BAR<sup>+</sup>): m/z 802 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>).

25

(Ejemplo B4)

Para producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluya un enlazador con una estructura principal de prolina, La L-prolina-diamida-amidita (tipo B) se sintetizó de acuerdo con el Esquema 4 que se muestra a continuación.

30



Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo

TBDMD: terc-butildimetilsililo

DMTr: 4,4'-dimetoxitritilo

Esquema 4

35

## (1) Fmoc-t-butil-dimetil siloxi amida-L-prolina (Compuesto 18)

La Fmoc-hidroxi-amida-L-prolina (Compuesto 4) (2,00 g, 30 mmol), cloruro de terc-butil-dimetil sililo (1,11 g, 35 mmol), e imidazol (10,90 g, 71 mmol) se mezclaron entre sí. La mezcla se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (20 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Tras finalizar la reacción, se añadió diclorometano (150 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó con agua tres veces, y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida, y la sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 95 : 5). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 18 en forma de un jarabe (2,35 g, rendimiento: 92%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,76-7,78 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,34 (m, 2H, Ar-H), 4,10-4,46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,47-3,59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,20-3,26 (m, 2H, CH), 1,85-1,95 (m, 2H), 1,42-1,55 (m, 6H), 0,96 (s, 9H, t-Bu), 0,02 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>);  
EM (BAR+): m/z 523 (M+H<sup>+</sup>).

## (2) t-Butil-dimetil siloxi amida-L-prolina (Compuesto 19)

A la Fmoc-t-butil dimetil siloxi amida-L-prolina (18) así obtenida (1,18 g, 2,5 mmol), se añadió acetonitrilo anhidro (5 ml) y piperidina (2,4 ml), y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras finalizar la reacción, se añadió acetonitrilo (50 ml) a la mezcla, y el material insoluble se eliminó por filtración. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 9 : 1). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 19 en forma de un jarabe (0,61 g, rendimiento: 90%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,71 (dd, 1H, J = 9,0 Hz, 5,2 Hz, CH), 3,61-3,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,22-3,28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,98-3,04 (m, 1H, CH), 2,86-2,91 (m, 1H, CH), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,86-1,93 (m, 1H, CH), 1,66-1,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,52-1,57 (m, 4H), 0,89 (s, 9H, t-Bu), 0,05 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>);  
EM (BAR+): m/z 301 (M+H).

## (3) t-Butil-dimetil siloxi amida hidroxiamida-L-prolina (Compuesto 20)

Se preparó una solución de diclorometano anhidro mezclando la t-butil-dimetil siloxi amida-L-prolina (Compuesto 19) (550 mg, 1,8 mmol), Se añadió ácido 6-hidroxicanoico (300 mg, 2,3 mmol), EDC (434 mg, 2,3 mmol), y 1-hidrobenzotriazol (695 mg, 4,5 mmol) en diclorometano anhidro (20 ml). Se añadió trietilamina (689 mg, 6,8 mmol) a esta solución a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y después, se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se lavó con una solución saturada de salmuera. Se recogió la capa orgánica, y la capa orgánica recogida se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 9 : 1). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 20 en forma de un jarabe (696 mg, rendimiento: 92%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H, (CDCl<sub>3</sub>): δ 4,54 (d, 1H, CH), 3,58-3,67 (m, 5H), 3,52-3,56 (m, 1H, CH), 3,32-3,39 (m, 1H), 3,20-3,25 (m, 2H), 2,40-2,43 (m, 1H, CH), 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,05-2,25 (m, 2H), 1,93-2,03 (m, 1H, CH), 1,75-1,85 (m, 1H, CH), 1,50-1,73 (m, 8H), 1,37-1,46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,87 (s, 9H, t-Bu), 0,04 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>);  
EM (BAR+): m/z 415 (M<sup>+</sup>+1).

## (4) DMTr-hidroxidiamida-L-prolina (tipo B) (Compuesto 21)

La t-Butil-dimetil siloxi amida hidroxiamida-L-prolina (Compuesto 20) así obtenida (640 mg, 1,54 mmol) se mezcló con piridina anhidra (1 ml), y la mezcla se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida 4, Se añadieron cloruro de 4-dimetoxitritilo (657 mg, 1,85 mmol), DMAP (2 mg), y piridina anhidra (5 ml), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió metanol (1 ml) a lo anterior, y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. A la sustancia residual obtenida se añadieron acetonitrilo anhidro (5 ml) y una solución de tetrahydrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (1,42 ml, fluoruro de tetrabutilamonio 1,42 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras finalizar la reacción, se añadió acetato de etilo (100 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó con agua, y después con una solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 95 : 5, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 21 en forma de un jarabe (680 mg, rendimiento: 73%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,41-7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (d, 6,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,61 (dd, 2H,  $J = 11$  Hz, 5,4 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,50-3,54 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,20-3,26 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,05 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,30 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,05-2,25 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,52-1,67 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ );  
EM (BAR $^+$ ): m/z 602 ( $\text{M}^+$ ), 303 ( $\text{DMTr}^+$ ).

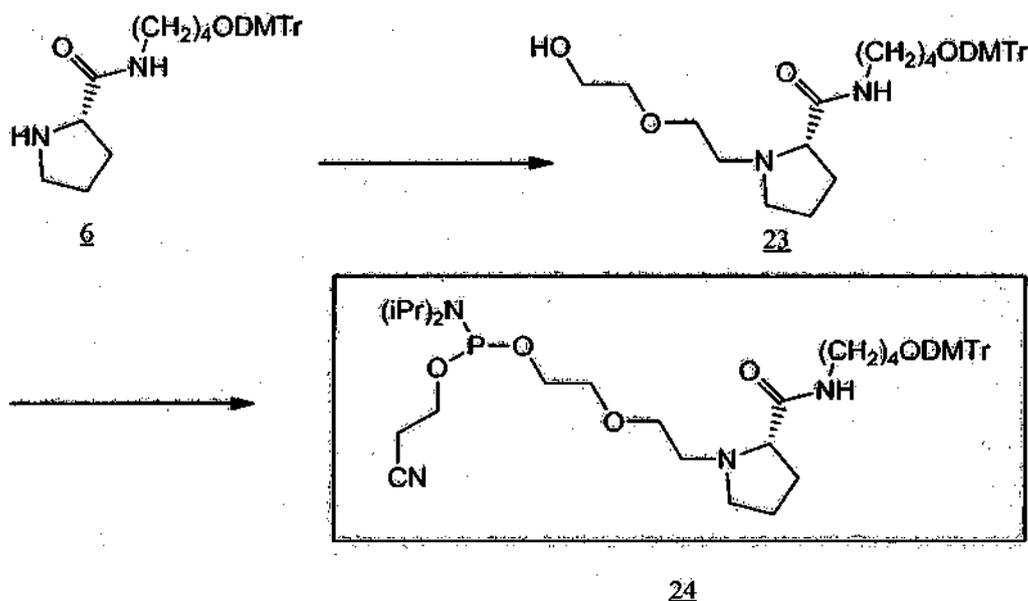
(5) DMTr-diamida-L-prolina amidita (tipo B) (Compuesto 22)

La DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina (Tipo B) (Compuesto 21) así obtenida (637 mg, 1,06 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida diisopropilamonio (201 mg, 1,16 mmol), y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y se añadió una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita en acetonitrilo anhidro (350 mg, 1,16 mmol) adicionalmente a lo anterior. Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando gel de sílice como relleno (eluyente hexano : acetona = 7 : 3). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 22 en forma de un jarabe (680 mg, pureza: 95%, rendimiento: 76%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,25-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,17-7,22 (m, 2H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,53 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 3H), 3,79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,46-3,68 (m, 5H), 3,34-3,41 (m, 1H, CH), 3,10-3,31 (m, 1H, CH), 3,05 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,62 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,39-2,46 (m, 1H, CH), 2,29 (t, 7,3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,90-2,00 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,18 (d,  $J = 6,4$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,16 (d,  $J = 6,4$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ );  
RMN P ( $\text{CH}_3$ ):  $\delta$  146,90;  
EM (BAR $^+$ ): m/z 803 ( $\text{M}^++1$ ), 303 ( $\text{DMTr}^+$ ).

(Ejemplo B5)

Para producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluya un enlazador con una estructura principal de prolina, La DMTr-amida etileno oxietil amino-L-prolina amidita (denominada a partir de ahora en el presente documento como "separador tipo PEG") se sintetizó de acuerdo con el Esquema 5 mostrado a continuación.



35

Esquema 5

(1) DMTr-amida hidroxietoxi etil amino-L-prolina (Compuesto 23)

La DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol), 2-(2-hidroxietoxi)etil éster del ácido 4-toluenosulfónico (3,10 g, 12,30 mmol), y se añadió una solución en dimetilformamida anhidra (10 ml) de carbonato de potasio (0,85 g, 6,15 mmol) se mezclaron entre sí, y la mezcla resultante se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. El disolvente de la mezcla se eliminó mediante evaporación a temperatura ambiente a presión

reducida. A continuación, se añadió diclorometano (20 ml) a lo anterior, y la mezcla resultante se filtró. El filtrado se concentró, y la sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice. Como eluyentes de la cromatografía en columna de gel de sílice se usaron, en primer lugar, acetato de etilo que contenía un 0,05% de piridina, y después, una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  = 9 : 1) que contenía un 0,05% de piridina. Como resultado, se obtuvo el Compuesto 23 en forma de un jarabe (1,15 g, rendimiento: 97%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,41-7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 3,79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,39-3,57 (m, 4H), 3,13-3,27 (m, 3H), 3,07-3,08 (m, 2H), 2,71-2,84 (m, 1H), 2,38-2,46 (m, 1H), 2,14-2,19 (m, 1H), 1,84-1,87 (m, 1H), 1,57-1,76 (m, 8H).

(2) DMTr-amida etileno oxi etil amino-L-prolina (Compuesto 24)

La DMTr-amida hidroxietoxi etil amino-L-prolina (Compuesto 23) así obtenida (0,63 g, 1,00 mmol) se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida diisopropilamonio (206 mg, 1,20 mmol). La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se rellenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y se añadió además una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita (282 mg, 1,12 mmol) en acetonitrilo anhidro. Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente del filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna usando gel de sílice como relleno (eluyente hexano : acetona = 7 : 3, que contenía piridina al 0,05%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 24 en forma de un jarabe (0,74 g, pureza: 100%, rendimiento: 87%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,18-7,22 (m, 1H, Ar-H), 6,84-6,86 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,47-3,64 (m, 7H), 3,15-3,23 (m, 1H), 3,11 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,01 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,95-2,99 (m, 1H), 2,58-2,63 (m, 2H), 2,31-2,35 (m, 1H, CH), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,48-1,78 (m, 10H), 1,12-1,57 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ );

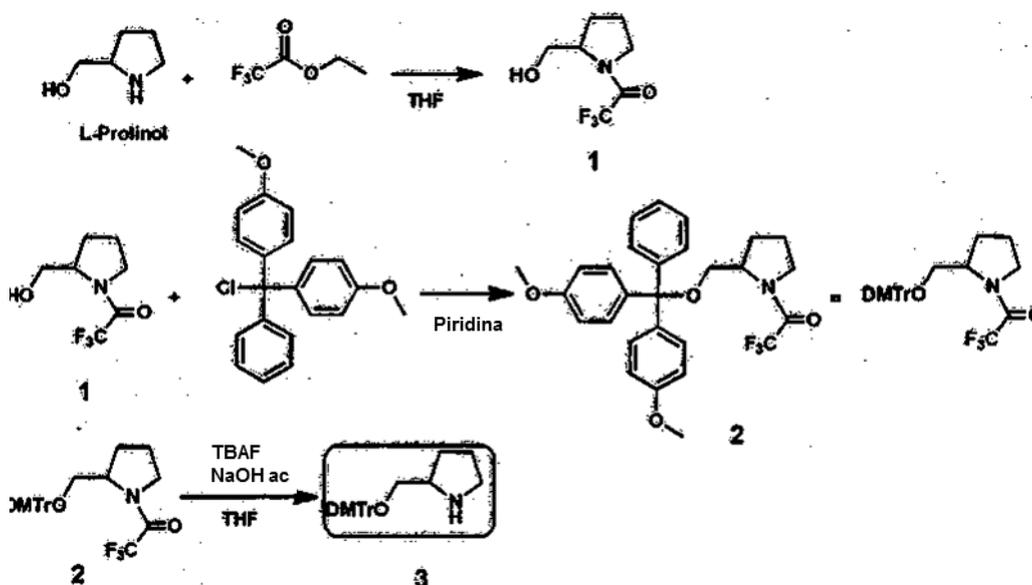
RMN P ( $\text{CD}_3$ ):  $\delta$  148,00;

EM (BAR+):  $m/z$  776 ( $\text{M}^+$ ), 303 (DMTr+) 201 ( $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$ ).

(Ejemplo B6)

### 1. Síntesis del prolinol protegido

De acuerdo con el Esquema 6 mostrado a continuación, se sintetizó el prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo (Compuesto 3).



Esquema 6

(1) Trifluoroacetil-L-prolinol (Compuesto 1)

L-Prolinol (2,0 g, 20 mmol) se disolvió en 20 ml de THF. Por otra parte, trifluoroacetato de etilo (3,0 g, 21 mmol) en 20 ml de THF. Después, el resto de solución de THF se instiló en la primera solución de THF que contenía el L-prolinol,

y esta se agitó durante 12 horas. Esta solución de reacción se concentró al vacío. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 1 (3,7 g, rendimiento: 97%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 4.28-4,23 (1.0H, m, OH), 3,90-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,27-1,77 (4H, H-3, H-4, m).

5

(2) Trifluoroacetil-DMTr-L-prolinol (Compuesto 2)

El trifluoroacetil-L-prolinol (Compuesto 1) así obtenido (3,7 g, 19 mmol) se disolvió en piridina, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente tres veces. La sustancia residual obtenida se disolvió en 15 ml de piridina, y se añadió cloruro de 4,4-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (8,1 g, 24 mmol) a esta mezcla mientras se agitaba la mezcla en un baño de hielo bajo atmósfera de argón. A continuación, se dejaron reaccionar adicionalmente durante 4 horas a temperatura ambiente. Después, para inactivar el exceso de DMTr-Cl, se añadieron adicionalmente 10 ml de metanol a la solución de reacción, y esta se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadió diclorometano a la solución de reacción, y la mezcla resultante se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica recogida tras el lavado se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 95 : 5, que contenía piridina al 0,1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 2 purificado (8,5 g, rendimiento: 89%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

10

15

20

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,39-7,18 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,70-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,19-1,85 (4H, H-3, H-4, m).

(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 3)

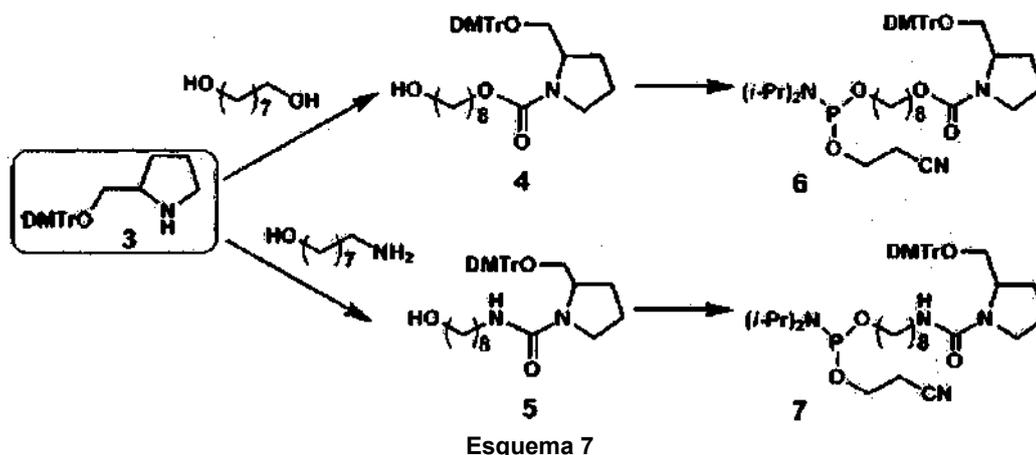
El trifluoroacetil-DMTr-L-prolinol (Compuesto 2) así obtenido (5 g, 10 mmol) en 100 ml de THF. Se añadieron 100 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5% a esta solución de THF, y esto se agitó a continuación. Se añadieron 5 ml de fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF) 1 M a esta solución, y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. Esta solución de reacción se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica recogida tras el lavado se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 3 (3,6 g, rendimiento: 90%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

30

35

## 2. Síntesis de derivados de amidita

Usando el prolinol protegido (Compuesto 3) sintetizado en el punto "1" anterior, se sintetizaron derivados de amidita que tienen prolinol unido en diferentes formas de unión de acuerdo con el Esquema 7 mostrado a continuación.



40

(1) DMTr-uretano-L-prolinol (Compuesto 4)

Se disolvió 1,8-hidroxibenzotriazol (9,0 g, 62 mmol) en 90 ml de THF, y esta solución se puso bajo atmósfera de argón. Por otra parte, se disolvió carbonildiimidazol (2,0 g, 12 mmol) en 10 ml de THF. La última solución de THF se añadió a la primera solución de THF, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de reacción se lavó con agua hasta que dejó de observarse la mancha de 1,8-octanodiol en TLC. Además, la capa orgánica recogida tras el lavado se lavó con una solución saturada de salmuera y se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 95 : 5). De esta manera, se obtuvo el compuesto del título

50

purificado. En este compuesto, un extremo del 1,8-octanodiol estaba activado con carbonildiimidazol (2,3 g, rendimiento: 77%).

0,9 g del compuesto se disolvió en 10 ml de acetonitrilo, y esta solución se puso bajo atmósfera de argón. Por otra parte, se disolvió el DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,9 g, 4,8 mmol) en 20 ml de acetonitrilo. La última solución de acetonitrilo se añadió a la primera solución de acetonitrilo, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después, esta solución de reacción se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 9 : 1, que contenía piridina al 0,1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 4 (prolinol-uretano-amidita) purificado (1,5 g, rendimiento: 65%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

BAR-MS: 576 [M+H]<sup>+</sup>

### (2) DMTr-ureido-L-prolinol (Compuesto 5)

Bajo atmósfera de argón, se disolvió trifosgeno (2,0 g, 6,7 mmol) en 10 ml de THF, y se agitó a 0°C. Por otra parte, se disolvió el DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,3 g, 3,2 mmol) y N, N-diisopropiletilamina (16 g, 124 mmol) en 10 ml de THF, y esta solución se instiló en la solución de trifosgeno en THF. Esta solución de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C y después durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, se añadió 8-amino-1-propanol (2,3 g, 16 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (5,0 g, 38 mmol) se disolvieron en 30 ml de THF. La solución de reacción que se había agitado se instiló en esta solución de THF, y se agitó durante 1 hora a 0°C y después durante 48 horas a temperatura ambiente. Esta solución de reacción se concentró al vacío, y la sustancia residual obtenida se disolvió en diclorometano. Esta solución se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica se recogió y secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó sometiendo a cromatografía en columna de gel de sílice en fase inversa. En este momento, el eluyente usado fue un disolvente mixto de acetona y agua, que contenía piridina al 0,1%, y la relación de mezclado entre la acetona y el agua se cambió de forma escalonada. Específicamente, la relación molar entre la acetona y el agua (acetona : agua) se cambió gradualmente para que fuera 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, y 5 : 5 en este orden. Una fracción que contenía el Compuesto 5 como compuesto diana se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica así obtenida se secó con sulfato sódico anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. De esta manera, se obtuvo el Compuesto 5 (prolinol-uretano-amidita) (0,9 g, rendimiento: 49%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,68-3,25 (9H, m, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>OH, H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

BAR-EM 575 (M+H)<sup>+</sup>.

### (3) Derivados de amidita que tienen prolinol (Compuestos 6 y 7)

Como prolinol modificado, el Compuesto 4 así obtenido (0,80 g, 1,4 mmol) se disolvió en acetonitrilo, y la mezcla resultante se sometió a destilación azeotrópica a temperatura ambiente tres veces. La sustancia residual obtenida se disolvió en 1 ml de acetonitrilo, y la solución se puso bajo atmósfera de argón. Se añadió tetrazolida diisopropilamonio (0,24 g, 1,4 mmol) a esta solución de acetonitrilo, proporcionando de esta forma una solución de reacción. Por otra parte, se disolvió 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforoamidita en acetonitrilo (0,50 g, 1,7 mmol) en 1 ml de acetonitrilo. Esta mezcla se añadió a la solución de reacción, y la mezcla resultante se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano a la solución de reacción, y la mezcla resultante se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución saturada de salmuera. La capa orgánica recogida tras el lavado se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a una cromatografía en columna de gel de aminosílice (eluyente: hexano : acetona = 10 : 1, que contenía piridina al 0,1%). De esta manera, se obtuvo el Compuesto 6 (DMTr-uretano-amidita) purificado (0,90 g, rendimiento: 83%). Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,72-2,96 (11H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,10-1,46 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH<sub>3</sub>). RMN <sup>31</sup>P RMN (CD<sub>3</sub>CN) δ 146,82.

BAR-MS: 776 (M+H)<sup>+</sup>.

El Compuesto 7 (DMTr-uretano-amidita) purificado (0,80 g, rendimiento: 74%) se obtuvo de la misma manera que se ha descrito anteriormente, excepto que, como prolinol modificado, el Compuesto 5 se utilizó en lugar del Compuesto 4. Se muestra a continuación el resultado del análisis mediante RMN relativo a este compuesto.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,65-3,25 (13H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH<sub>3</sub>).

RMN <sup>31</sup>P RMN (CD<sub>3</sub>CN) δ 146,83.  
 BAR-MS: 775 [M+H]<sup>+</sup>

5 Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en referencia a las realizaciones y ejemplos ilustrativos; la invención no se limita en forma alguna a lo anterior. Se pueden realizar varios cambios y modificaciones que pueden ser evidentes para los expertos en la materia, en las configuraciones y especificaciones de la presente invención, sin alcance de la presente invención.

10 **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con la molécula de ARN monocatenaria de la presente invención, es posible inhibir la expresión de un gen. Además, puesto que la molécula de ARN monocatenaria no es circular, se puede sintetizar fácilmente. Asimismo, puesto que se trata de una cadena simple, no es necesaria una etapa de hibridación, tal como se requiere en la producción de una cadena doble, por lo tanto se puede producir eficazmente. Como se ha descrito anteriormente, ya que la molécula ssNc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana, es útil como, por ejemplo, un agente farmacéutico, un agente diagnóstico, un fitoquímico, y para realizar investigaciones sobre fitoquímicos, ciencia médica, ciencias de la vida, y similares.

20 **Listado de secuencias**

TF11005WO.ST25.txt

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> BONAC CORPORATION

<120> Molécula de ácido nucleico monocatenario para controlar la expresión génica

30 <130> TF11005WO

<150> JP 2010-156122  
 <151> 08-07-2010

35 <150> JP 2010-174915  
 <151> 03-08-2010

<150> JP 2010-230806  
 <151> 13-10-2010

40 <150> JP 2010-230808  
 <151> 13-10-2010

<150> JP 2010-269823  
 <151> 02-12-2010

45 <150> JP 2010-269824  
 <151> 02-12-2010

50 <160> 80

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
 <211> 19

55 <212> ARN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ARNip

60 <400> 1  
 guugucauac uucucaugg 19

<210>2  
 <211> 62

65

<212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> molécula de ácido nucleico  
  
 <400> 2  
  
     **caugagaagu augacaacag cccacacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg**      **60**  
     **aa**      **62**  
 10  
     <210>3  
     <211>21  
     <212> ARN  
     <213> Artificial  
 15  
     <220>  
     <223> sentido directo  
  
     <400> 3  
 20      **ccaugagaag uaugacaaca g**      **21**  
  
     <210>4  
     <211>21  
     <212> ARN  
 25      <213> Artificial  
  
     <220>  
     <223> sentido contrario  
 30  
     <400> 4  
     **guugucauac uucucauggu u**      **21**  
  
     <210>5  
     <211> 19  
 35      <212> ARN  
     <213> Artificial  
  
     <220>  
     <223> ARNip  
 40  
     <400> 5  
     **auuguaacga gacaacac**      **19**  
  
     <210>6  
     <211> 19  
     <212> ARN  
     <213> Artificial  
  
     <220>  
     <223> ARNip  
 50  
     <400>6  
     **uugcgcuuuu uggugacgc** 19  
  
     <210>7  
     <211> 62  
     <212> ARN  
     <213> Artificial  
 55  
  
 60      <220>  
     <223> molécula de ácido nucleico

<400> 7

**agccccacac cggcugugug cauacucuc augguucuc ggaaccauga gaaguangac 60**

**aa 62**

5 <210>8  
<211> 58  
<212> ARN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 8  
accaugagaa guaugacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guucaugg 58

15 <210>9  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> cebador

<400> 9  
ggagaaggct ggggctcatt tgc 23

25 <210> 10  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> cebador

35 <400> 10  
tggccagggg tgctaagcag ttg 23

40 <210> 11  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> cebador

<400> 11  
gccacggctg ctccagctc ctc 23

50 <210> 12  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> cebador

<400> 12  
aggctttgc ggatgtccac gtcac 25

60 <210> 13

<211>51  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 13  
 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

10

<210> 14  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

20

<400> 14  
**augacaacag cccacacccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga 60**  
**ag 62**

25

<210> 15  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 15  
**ugucagugcu cauuuacaag cccacacccg gcuuugaaa u gagcacugac acuucucgg 60**  
**aa 62**

35

<210> 16  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> ARNip

<400> 16  
 aaagucuaug uacagcugcu u 21

45

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> cebador

<400> 17  
 ccattgctgt ccggtgcaga gctg 24

55

<210> 18  
 <211> 25

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador  
  
 <400> 18  
 atggtagccc ttgggctcgt ggatc 25  
  
 10 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 19  
 20 gtcgtaccac aggcattgt atgg 24  
  
 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 20  
 30 gcaatgcctg ggtacatggt gg 22  
  
 <210>21  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40  
 <400>21  
 cccttattga cctcaactac atggt 25  
  
 <210> 22  
 <211> 23  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 50  
 <400> 22  
 gaggggcat ccaeagtctt ctg 23  
  
 <210> 23  
 <211>21  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 60  
 <400> 23  
 actccacgtg gaaatcaacg g 21

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 24  
 10 tagtagacga tgggcagtg 20  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> cebador  
 20  
 <400> 25  
 atggctagrc tctgtgcttc ct 22  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador  
 30  
 <400> 26  
 agggctctcc agayttctgc tctg 24  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> cebador  
 40  
 <400> 27  
 catcaactat aagcagctcc a 21  
 45  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 28  
 55 ttcaagtgga gagcagttca g 21  
 <210> 29  
 <211> 61  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 29

**agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucaa uguacagcug cuucuucgga 60**

**a 61**

5 <210> 30  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 30

**agcagcugua cauugacuuu agcccccacac cggcuaaaagu caauguacag cugcuucuuc 60**

**gg 62**

15 <210>31  
<211>61  
<212> ARN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

25 <400>31

**gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcuucuucg 60**

**g 61**

30 <210> 32  
<211>51  
<212> ARN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 32  
cagcuguaca uugacuuuag cggcuaaaag ucaauguaca gcugcuucga a 51

40 <210> 33  
<211> 50  
<212> ARN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 33  
agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaaagu caauguacag cugcuucga 50

50 <210> 34  
<211>51  
<212> ARN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

ES 2 550 487 T3

	<400> 34		
	agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g	51	
5	<210> 35 <211> 50 <212> ARN <213> Artificial		
10	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 35		
	gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg	50	
15	<210> 36 <211>51 <212> ARN <213> Artificial		
20	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 36		
25	ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a	51	
30	<210> 37 <211> 63 <212> ARN <213> Artificial		
35	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 37		
	<b>accaugagaa guaugacaac agccuucaag agaggcuguu gucauacuuc ucaugguuca</b>	<b>60</b>	
	<b>ugg</b>	<b>63</b>	
40	<210> 38 <211>51 <212> ARN <213> Artificial		
45	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 38		
	ccaucaacga uaagugaaag ccggcuuua cuuauuguug auggcuuuca a	51	
50	<210> 39 <211>21 <212> ARN <213> Artificial		
55	<220> <223> sentido directo		
	<400> 39		
	gcagcuguac auugacuuua g	21	
60	<210> 40 <211>21		

<212> ARN  
 <213> Artificial

5  
 <220>  
 <223> sentido contrario

<400> 40  
 aaaguc~~aaug~~ uacagcugcu u 21

10  
 <210>41  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

15  
 <220>  
 <223> sentido directo

<400>41  
 gugucagugc ucauuuacaa g 21

20  
 <210> 42  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

25  
 <220>  
 <223> sentido contrario

<400> 42  
 uguaaaugag cacugacacu u 21

30  
 <210> 43  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

35  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

40  
 <400> 43

**uguuugucuc guuacaauau cccacacccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg 60**  
**ga 62**

45  
 <210> 44  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

50  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 44  
**aguguuuguc ucguuacaau aucccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc 60**  
**gg 62**

55  
 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60

<220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 45  
 5 aaagctgccca atgcccctcg acc 23  
  
 <210> 46  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 46  
 15 taggtgggtg gccctcgtct tg 22  
  
 <210> 47  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 25 <400> 47  
  
**cgucaccaaa aagcgcaau cccacaccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucucgg 60**  
**aa 62**  
  
 <210> 48  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 35 <400> 48  
  
**agcgucacca aaaagcgcaa uccccacac cggaauugcg cuuuuggug acgcuucuc 60**  
**gg 62**  
  
 <210> 49  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 49  
 50 ctggacatca agctggccct ggac 24  
  
 <210> 50  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador

ES 2 550 487 T3

	<400> 50		
	caccagcttg cgc atggcca cttc	24	
5	<210>51 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
10	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400>51		
	<b>aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca cggcugugug ucauacuucu caugguucuu</b>	<b>60</b>	
15	<b>cg</b>	<b>62</b>	
	<210> 52 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
20	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
25	<400> 52		
	<b>accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcugugug ucauacuucu augguucuc</b>	<b>60</b>	
	<b>gg</b>	<b>62</b>	
30	<210> 53 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
35	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 53		
	<b>ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguguc auacuucua ugguucucg</b>	<b>60</b>	
40	<b>ga</b>	<b>62</b>	
	<210> 54 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
45	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 54		
50	<b>augagaagua ugacaacagc cccacaccgg cuguguc auacuucuaug guucucgga</b>	<b>60</b>	
	<b>ac</b>	<b>62</b>	
55	<210> 55 <211> 62 <212> ARN		

<213> Artificial

<220>  
<223> molécula de ácido nucleico

5 <400> 55

**ugagaaguau gacaacagcc ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucuucggaa 60**

**cc 62**

10 <210> 56  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 56

**agaaguaua caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc 60**

**au 62**

20 <210> 57  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

30 <400> 57

**aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaaccau 60**

**ga 62**

35 <210> 58  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 58

**guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga 60**

**ga 62**

45 <210> 59  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> molécula de ácido nucleico

55 <400> 59

	<b>acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu</b>	<b>60</b>
	<b>au</b>	<b>62</b>
5	<210> 60 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> molécula de ácido nucleico  <400> 60	
	<b>aacagcccca caccggcugu ugucauacuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau</b>	<b>60</b>
	<b>ga</b>	<b>62</b>
15	<210>61 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> molécula de ácido nucleico  <400> 61	
	<b>cagccccaca cgggcuguug ucauacuucu caugguucuu cggaaccaug agaaguanga</b>	<b>60</b>
25	<b>ca</b>	<b>62</b>
30	<210> 62 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> molécula de ácido nucleico  <400> 62	
	<b>gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguuucucg gaaccaugag aaguaugaca</b>	<b>60</b>
	<b>ac</b>	<b>62</b>
40	<210> 63 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> molécula de ácido nucleico  <400> 63	
	<b>ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga aaguaugaca</b>	<b>60</b>
50	<b>ca</b>	<b>62</b>

ES 2 550 487 T3

<210> 64  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 <400> 64  
 10  
**cccacaccgg cuguugucau acuucucaug giucucggga accaugagaa guaugacaac 60**  
**ag 62**  
 <210> 65  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 20  
 <400> 65  
**ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucucggaa ccaugagaag uaugacaaca 60**  
**gc 62**  
 25  
 <210> 66  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 <400> 66  
**aaccaugaga agaugacaac cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu 60**  
**ucgc 64**  
 35  
 <210> 67  
 <211> 60  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 45  
 <400> 67  
 accaugagaa guaugacaac agcccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60  
 <210> 68  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 55  
 <400> 68  
 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccg cuguugucau acuucucaug guuuucga 58

ES 2 550 487 T3

<210> 69  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 <400> 69  
 10 accaugagaa guaugacaac agccacaccc uguugucaua cuucucaugg uucuucgg 58  
 <210> 70  
 <211> 56  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 20  
 <400> 70  
 ccaugagaag uaugacaaca gccacacccu guugucauac uucucauggu uuucga 56  
 <210> 71  
 <211> 54  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 30  
 <400> 71  
 caugagaagu augacaacag ccacaccucg uugucauacu ucucaugguu ucga 54  
 <210> 72  
 <211> 54  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 40  
 <400> 72  
 ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucuuacu cuucaugguuu ucga 54  
 <210> 73  
 <211> 52  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 50  
 <400> 73  
 caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuuc ucaugguuuc ga 52  
 55  
 <210> 74  
 <211> 63  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> molécula de ácido nucleico  
 <400> 74

	<b>aaccaugaga</b>	<b>aguaugacaa</b>	<b>cagccccaca</b>	<b>ccggcuguug</b>	<b>ucauacuucu</b>	<b>caugguucu</b>	<b>60</b>
	<b>cgg</b>						<b>63</b>
5	<210> 75	<211> 61	<212> ARN	<213> Artificial			
10	<220>	<223> molécula de ácido nucleico					
	<400> 75						
	<b>ccaugagaag</b>	<b>uaugacaaca</b>	<b>gccccacacc</b>	<b>ggcuguuguc</b>	<b>auacuucuca</b>	<b>ugguucuucg</b>	<b>60</b>
	<b>g</b>						<b>61</b>
15	<210> 76	<211> 60	<212> ARN	<213> Artificial			
20	<220>	<223> molécula de ácido nucleico					
	<400> 76						
25	caugagaagu	augacaacag	ccccacaccg	gcuguuguca	uacuucucuu	ggucuucugg	60
30	<210> 77	<211> 62	<212> ARN	<213> Artificial			
35	<220>	<223> molécula de ácido nucleico					
	<400> 77						
	<b>accaugagaa</b>	<b>guaugacaac</b>	<b>agccuucggg</b>	<b>cuguugucuu</b>	<b>acuucucaug</b>	<b>guucccacac</b>	<b>60</b>
	<b>cg</b>						<b>62</b>
40	<210> 78	<211> 65	<212> ARN	<213> Artificial			
45	<220>	<223> molécula de ácido nucleico					
	<400> 78						
	<b>ggaaccauga</b>	<b>gaaguaugac</b>	<b>aacagccaag</b>	<b>ucuuaggcugu</b>	<b>ugucauacuu</b>	<b>cucauggguuc</b>	<b>60</b>
	<b>cucug</b>						<b>65</b>
50	<210> 79	<211> 63	<212> ARN	<213> Artificial			

ES 2 550 487 T3

<220>

<223> molécula de ácido nucleico

<400> 79

5

**ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag cuuggcuguu gucauacuuc ucaugguucc 60**

**ucg 63**

<210> 80

<211> 62

10

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> molécula de ácido nucleico

15

<400> 80

**cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg 60**

**aa 62**

20

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ARN monocatenario que comprende solamente una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, donde:

- 5 - la molécula comprende, en secuencia, desde un lado 5' a un lado 3': una región en el lado 5' (Xc); una región interna (Z) que comprende la secuencia inhibidora de la expresión y que está compuesta por una región interna en el lado 5' (X) y una región interna en el lado 3' (Y) que están unidas entre sí; y una región en el lado 3' (Yc);
- 10 - la región del lado 5' (Xc) es complementaria de la región interna del lado 5' (X);
- la región del lado 3' (Yc) es complementaria de la región interna del lado 3' (Y);
- la región del lado 5' (Xc) y la región interna del lado 5' (X) están unidas entre sí mediante una región enlazadora (Lx) que no se autohibrida consigo misma;
- la región del lado 3' (Yc) y la región interna del lado 3' (Y) están unidas entre sí a una región enlazadora (Ly) que no se autohibrida consigo misma;
- 15 - el número de bases (Z) de la región interna (Z), el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X), el número de bases (Y) en la región interna del lado 3' (Y), el número de bases (Xc) en la región interna del lado 5' (Xc) y el número de bases (Yc) en la región del lado 3' (Yc) satisfacen preferentemente las siguientes condiciones:

$$Z = X + Y;$$

$$Z > Xc + Yc;$$

$$Z = 19 \text{ a } 30;$$

$$Xc = 1 \text{ a } 7 \text{ o } Yc = 1 \text{ a } 9;$$

y

$$Z - (Xc + Yc) = 0 \text{ o } 1 \text{ a } 10;$$

y

- el número bases en cada una de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) es de 3 a 50.

2. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la reivindicación 1, donde el número bases en cada una de las regiones enlazadoras (Lx) y (Ly) es de hasta 30.

3. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el número de bases (X) de la región interna del lado 5' (X), el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc), el número de bases (Y) en la región interna del lado 3' (Y) y el número de bases (Yc) en la región interna del lado 3' (Yc) satisfacen cualquiera de las siguientes condiciones (a) a (d):

(a) se satisfacen las condiciones de las expresiones (3) y (4):

$$X > Xc \dots (3)$$

$$Y = Yc \dots (4)$$

(b) se satisfacen las condiciones de las expresiones (5) y (6):

$$X = Xc \dots (5)$$

$$Y > Yc \dots (6)$$

(c) se satisfacen las condiciones de las expresiones (7) y (8):

$$X > Xc \dots (7)$$

$$Y > Yc \dots (8)$$

(d) se satisfacen las condiciones de las expresiones (9) y (10):

$$X = Xc \dots (9)$$

$$Y = Yc \dots (10).$$

4. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la reivindicación 3, donde, en las condiciones (a) a (d), la diferencia entre el número de bases (X) en la región interna del lado 5' (X) y el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc) y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región interna del lado 3' (Y) y el número de bases (Yc) en la región del lado 3' (Yc) satisface las siguientes condiciones:

(a) se satisfacen las condiciones de las expresiones (11) y (12):

$$X - Xc = 1, 2 \text{ o } 3 \dots(11)$$

$$Y - Yc = 0 \dots(12)$$

(b) se satisfacen las condiciones de las expresiones (13) y (14):

$$X - Xc = 0 \dots(13)$$

$$Y - Yc = 1, 2 \text{ o } 3 \dots(14)$$

(c) se satisfacen las condiciones de las expresiones (15) y (16):

$$X - Xc = 1, 2 \text{ o } 3 \dots(15)$$

$$Y - Yc = 1, 2 \text{ o } 3 \dots(16)$$

(d) se satisfacen las condiciones de las expresiones (17) y (18):

$$X - Xc = 0 \dots(17)$$

$$Y - Yc = 0 \dots(18).$$

5. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

- el número de bases Z - (Xc + Yc) es 1 a 4; o
- el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc) es 1 a 11; o
- el número de bases (Yc) en la región del lado 3' (Yc) es 1 a 11.

6. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la reivindicación 5, donde:

- el número de bases Z - (Xc + Yc) es 1, 2 o 3; o
- el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc) es 1 a 7; o
- el número de bases (Y) en la región del lado 3' (Yc) es 1 a 7.

7. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con la reivindicación 6, donde:

- el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc) es 1 a 3; o
- el número de bases (Yc) en la región del lado 3' (Yc) es 1 a 3.

8. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un resto modificado,

y/o que comprende además una sustancia marcadora, y/o que comprende además un isótopo estable.

9. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la región enlazadora (Lx) y/o la región enlazadora (Ly) está compuesta por restos de nucleótidos sin modificar.

10. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la región enlazadora (Lx) y/o la región enlazadora (Ly) está compuesta por restos de nucleótidos modificados.

11. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la región enlazadora (Lx) y/o la región enlazadora (Ly) está compuesta por restos de nucleótidos sin modificar y restos de nucleótidos modificados.

12. La molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

- el número total de bases en la molécula de ARN monocatenario es de 50 o más; y/o
- la secuencia de bases de la molécula de ácido nucleico monocatenario es cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 7, 8, 13, 14, 29 a 35, 37, 43, 44, 47, 48, y 51 a 80.

5 13. Una composición para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo la composición la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

14. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

10 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en un método de tratamiento de la inflamación.

15 16. Un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el método:

- utilizar la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y
- administrar la molécula de ARN monocatenario a una célula, un tejido, o un órgano.

20 17. Un método *in vitro* para inducir la interferencia del ARN que inhibe la expresión de un gen diana, comprendiendo el método:

- utilizar la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

25 18. una molécula de ARN para el uso en un método de tratamiento de una enfermedad, donde

- la molécula de ARN es la molécula de ARN monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y
- la molécula de ARN monocatenario comprende, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que produce la enfermedad.

30

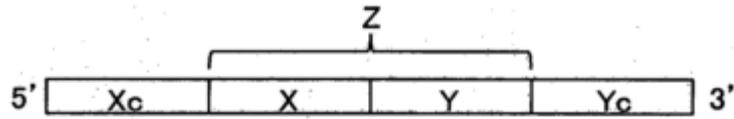


FIG. 1A

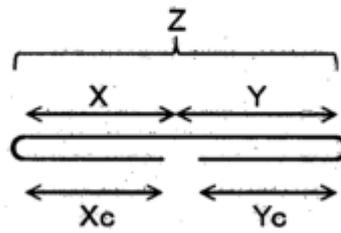


FIG. 1B

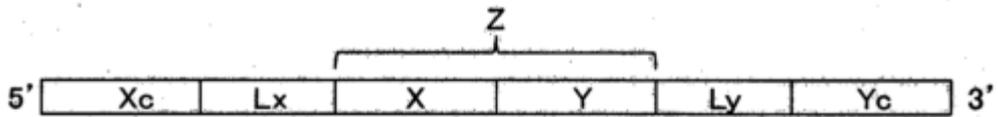


FIG. 2A

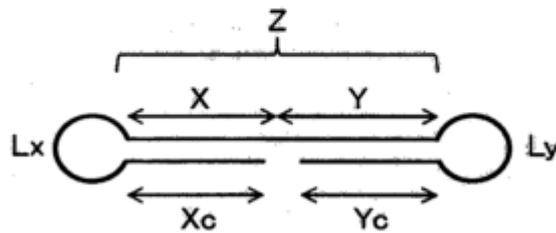


FIG. 2B

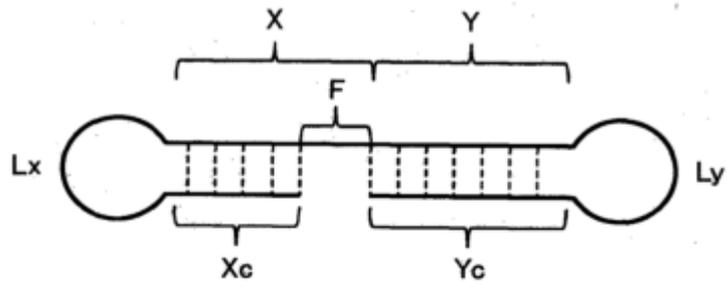


FIG. 3A

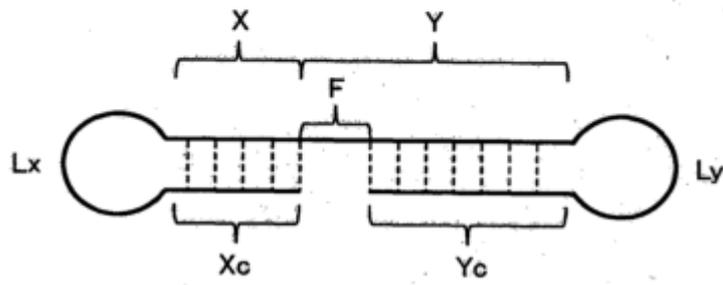


FIG. 3B

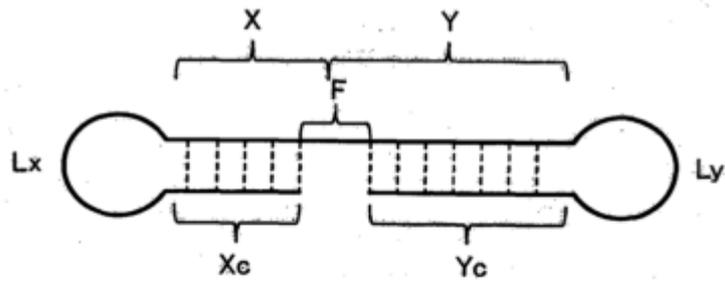


FIG. 3C

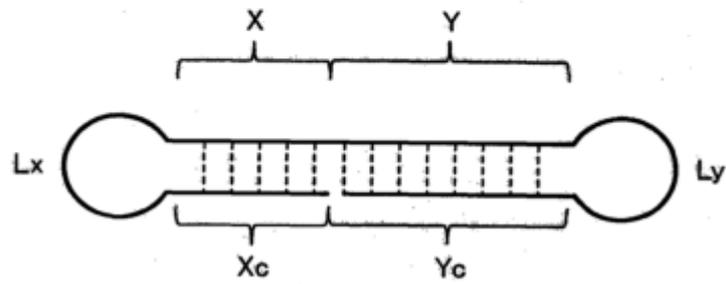


FIG. 3D

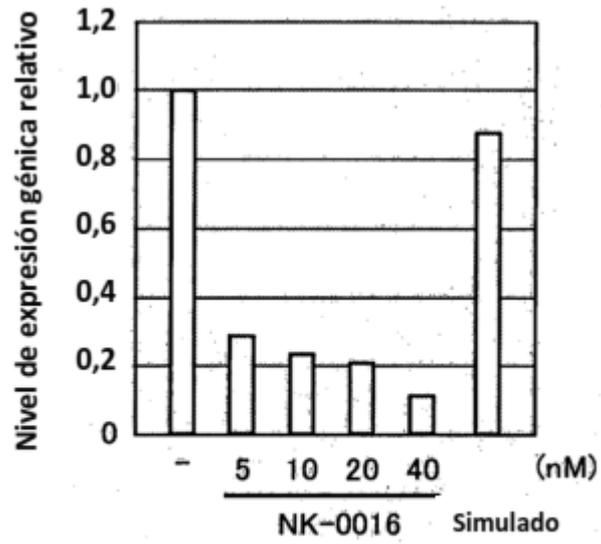


FIG. 4

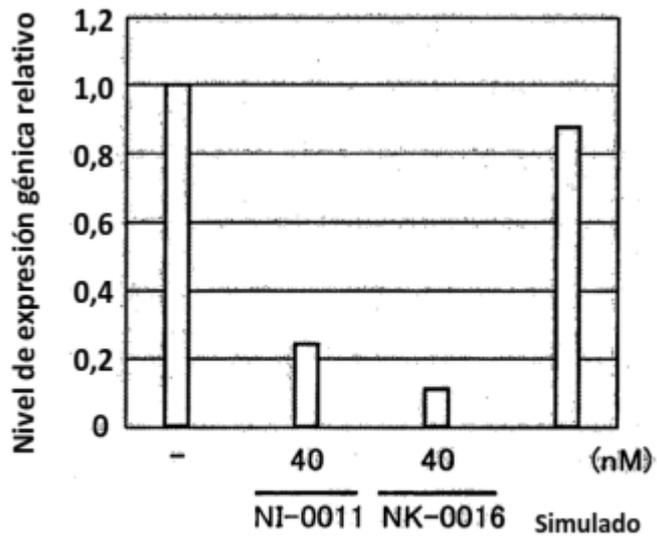
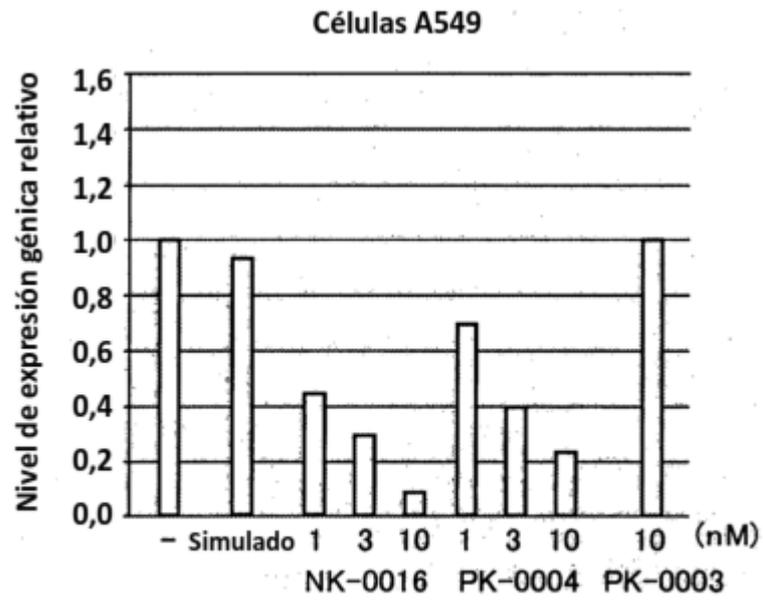
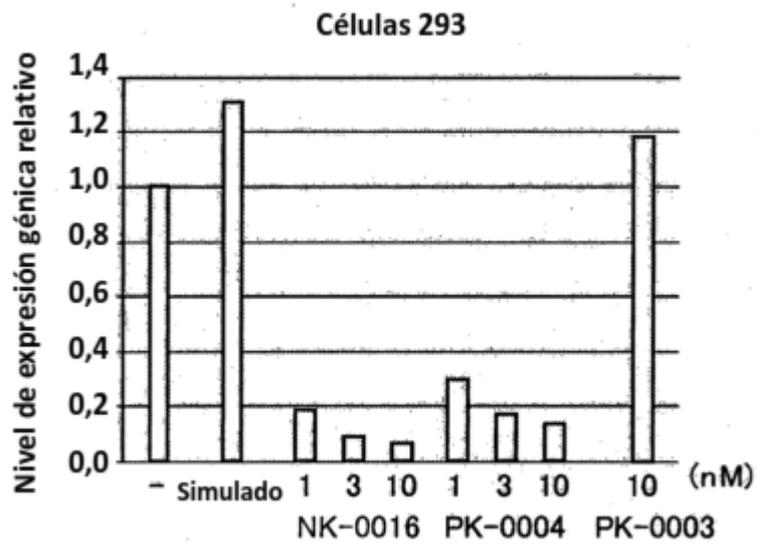


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

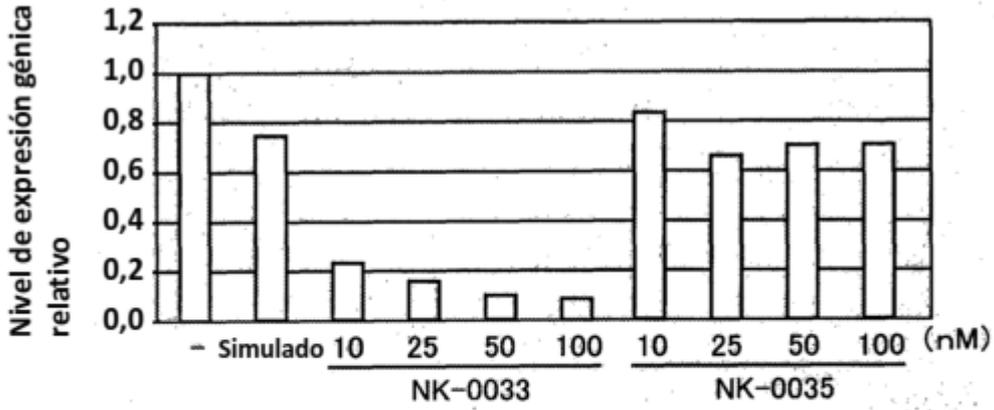


FIG. 8

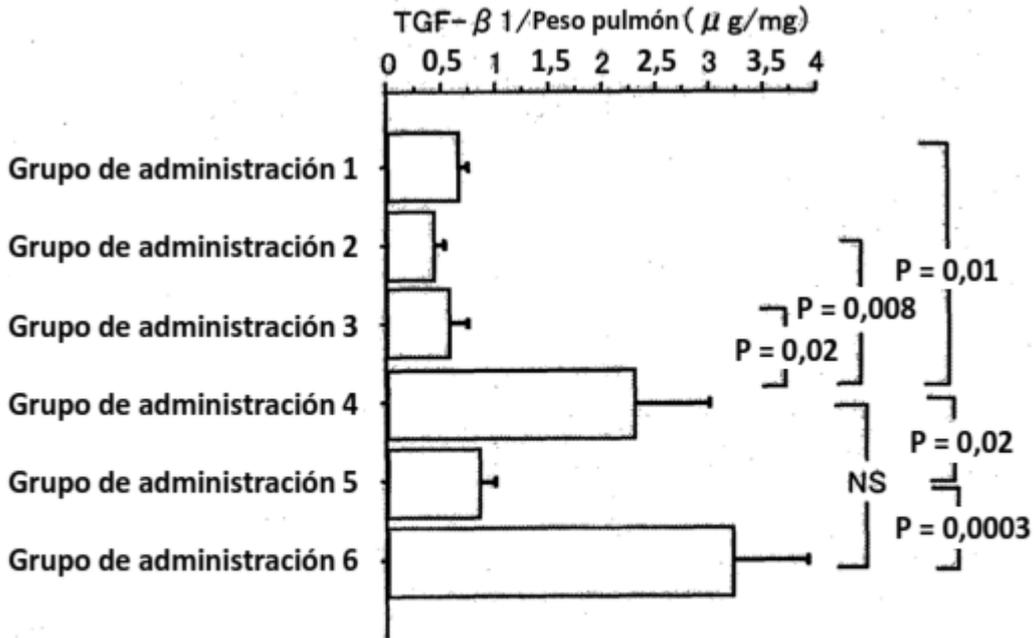


FIG. 9

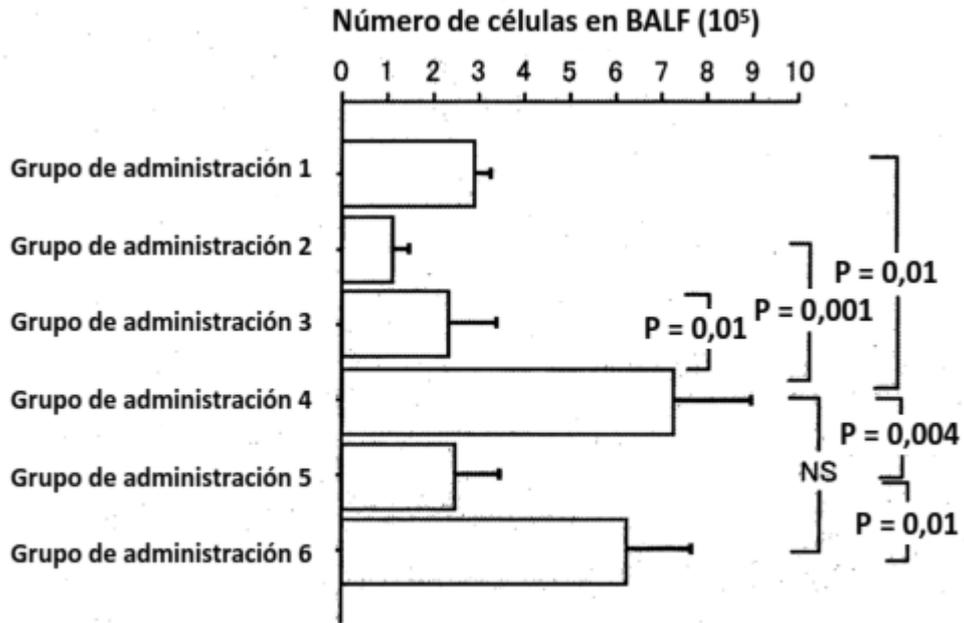


FIG. 10

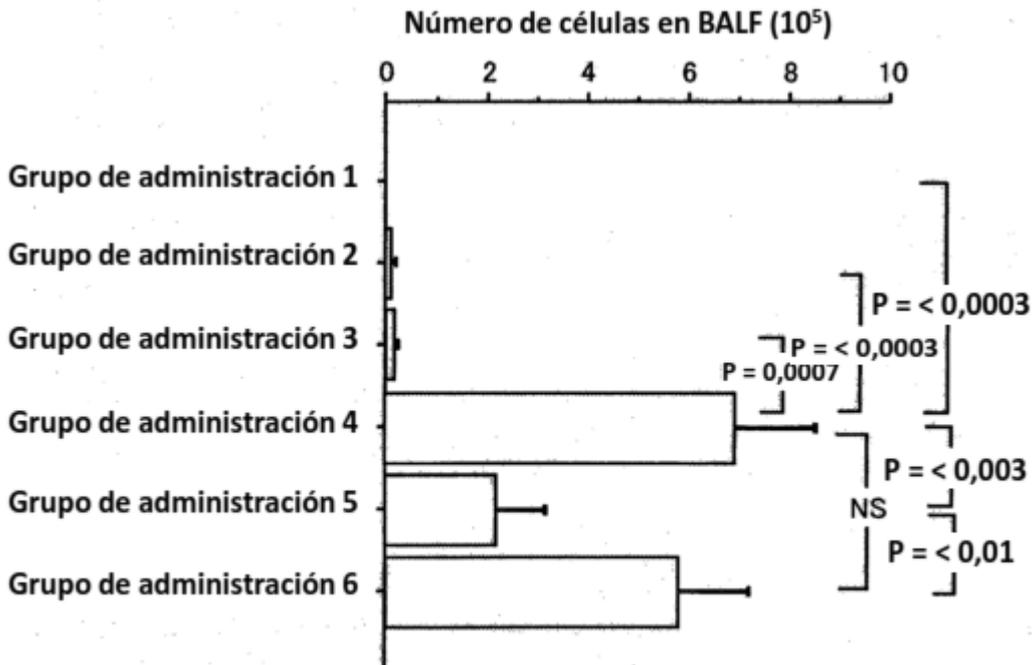
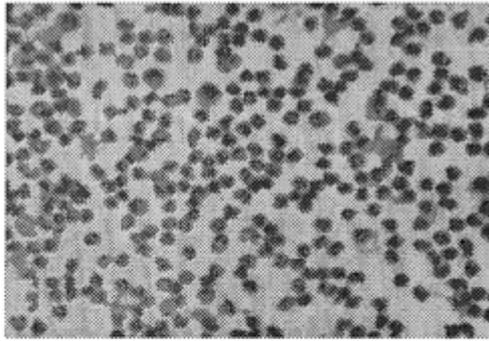


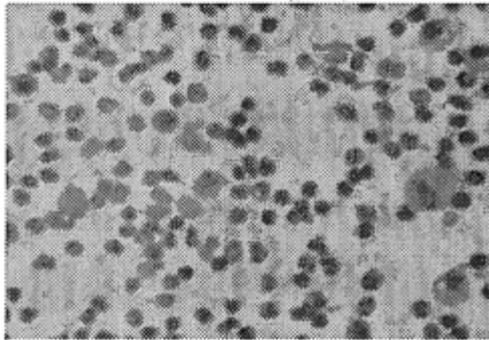
FIG. 11

ARNss (-)



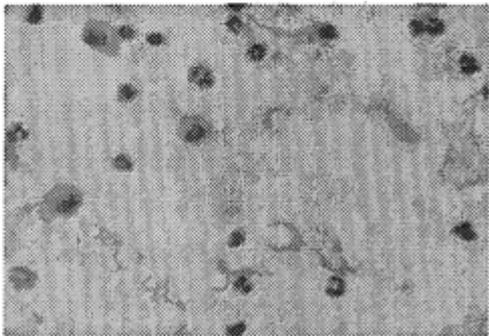
**FIG. 12A**

NK-0035 (+)



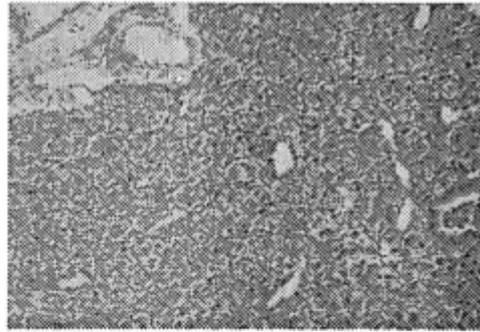
**FIG. 12B**

NK-0033 (+)



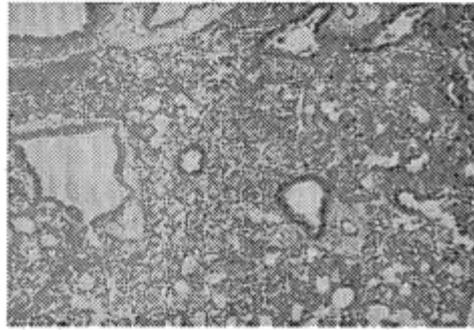
**FIG. 12C**

ARNss (-)



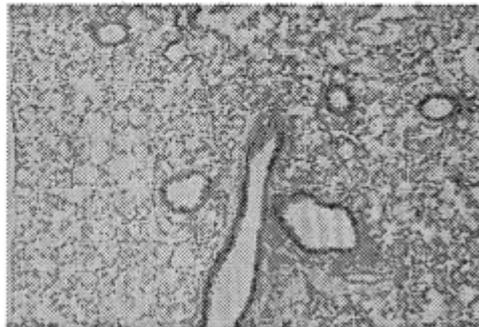
**FIG. 13A**

NK-0035 (+)



**FIG. 13B**

NK-0033 (+)



**FIG. 13C**

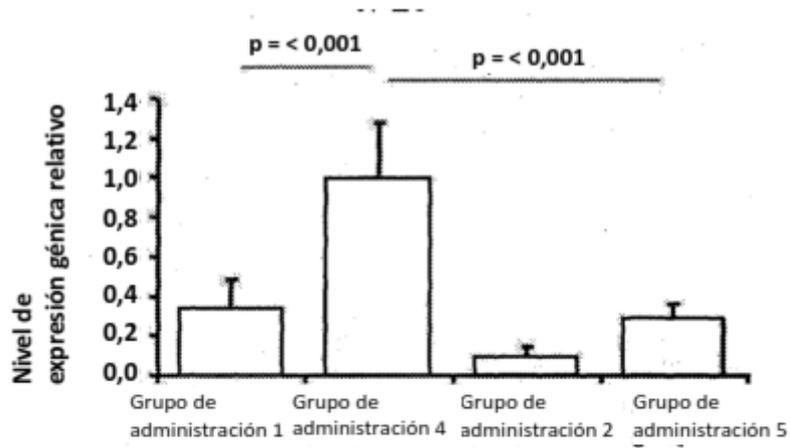


FIG. 14A

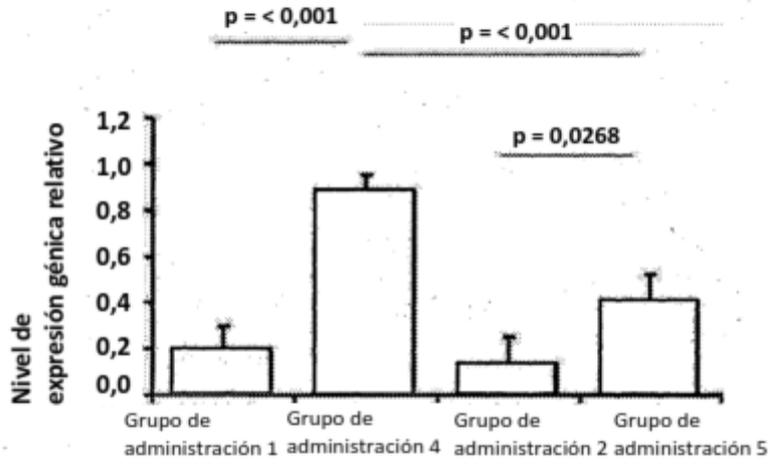


FIG. 14B

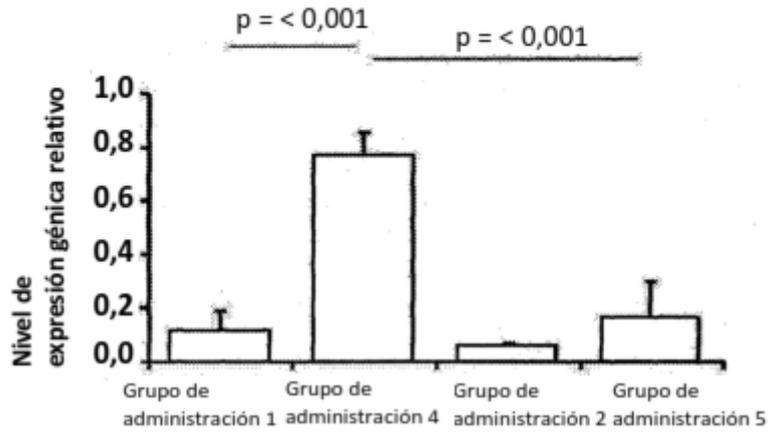


FIG. 14C

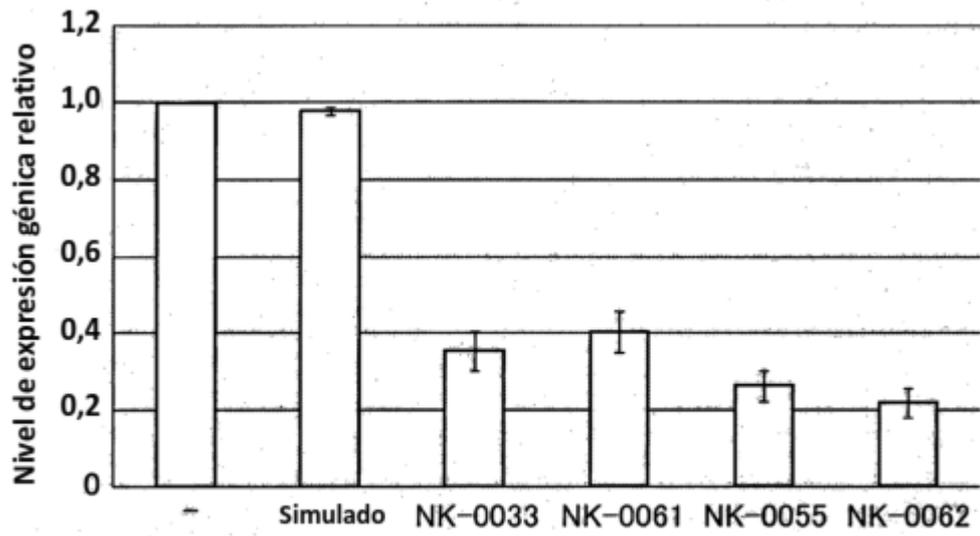


FIG. 15

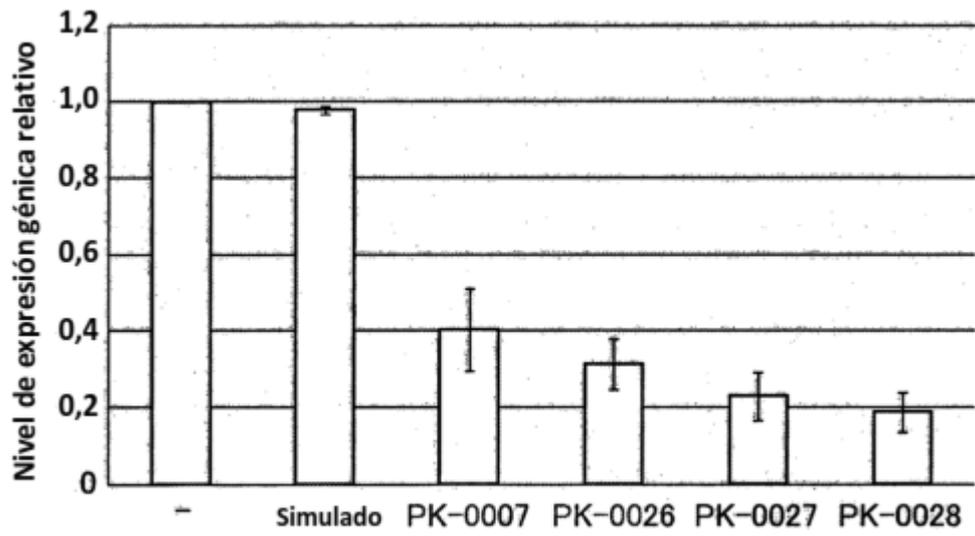


FIG. 16

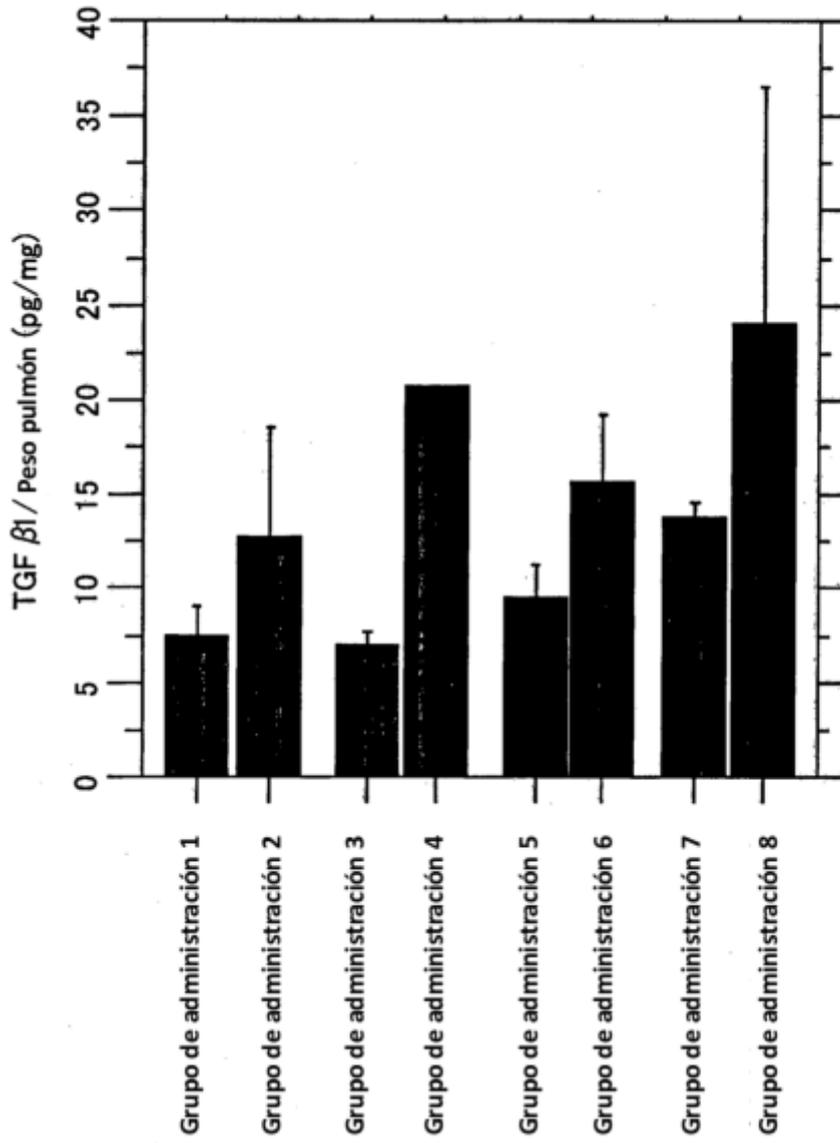


FIG. 17

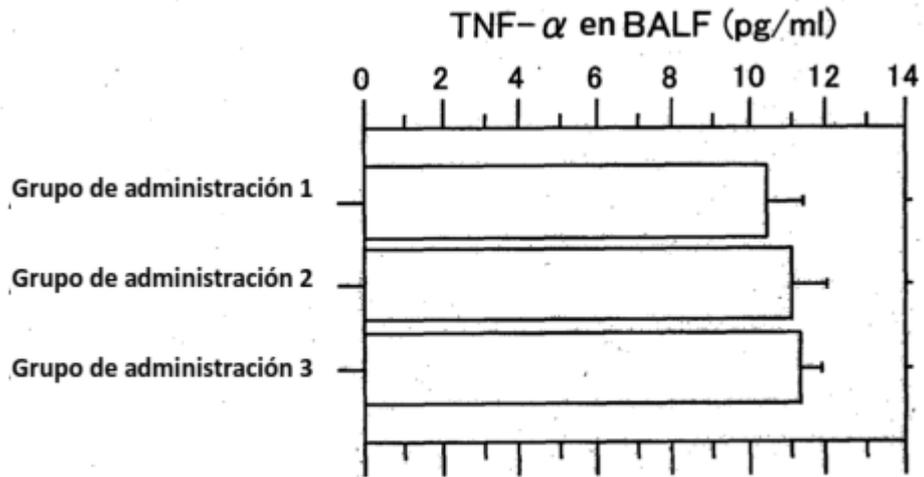


FIG. 18A

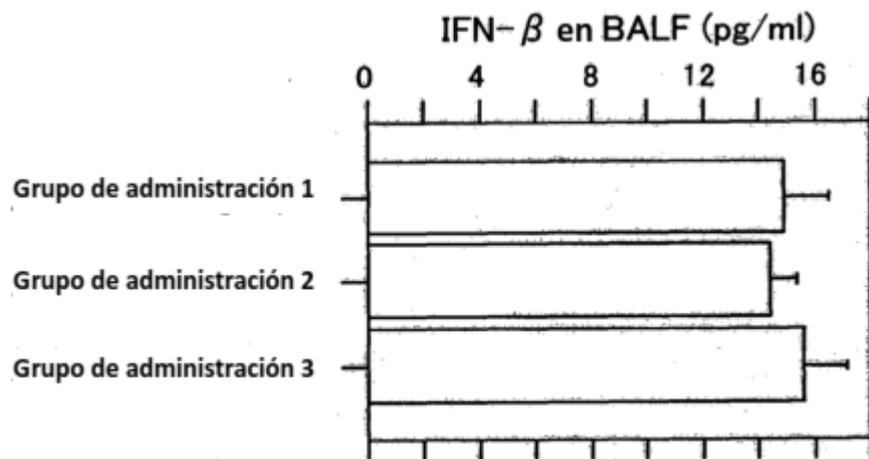


FIG. 18B

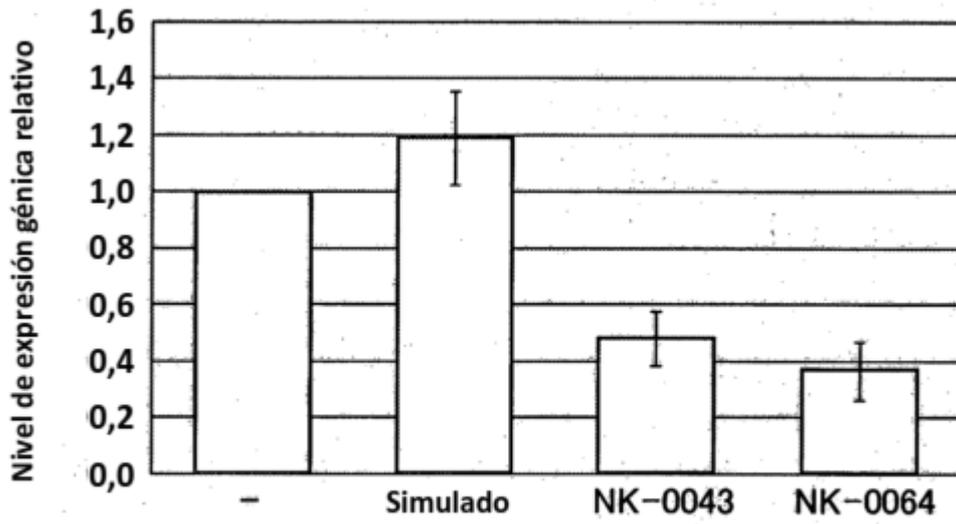


FIG. 19

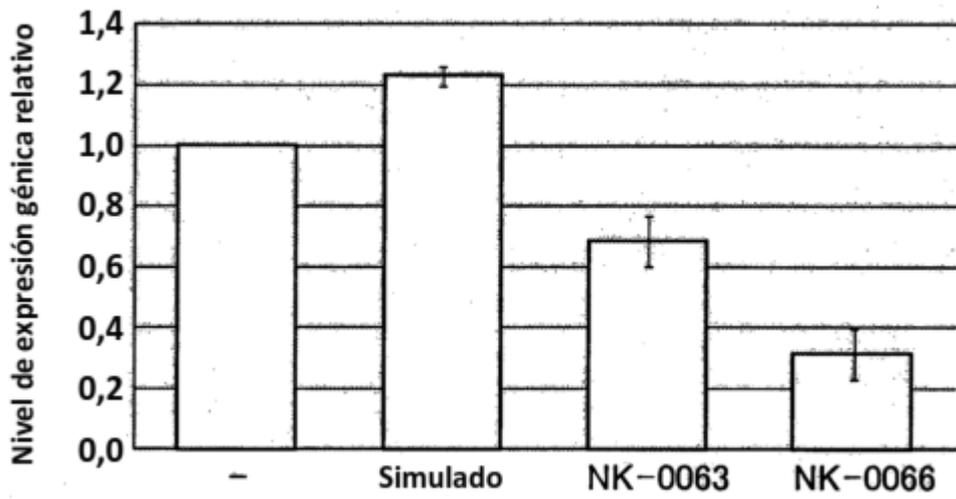


FIG. 20

Xc/Yc	
NK-0036	25/1 5' - <u>aacc</u> au <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gc <u>uc</u> gu <u>guc</u> au <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 51
NK-0025	24/1 5' - <u>acc</u> au <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 52
NK-0037	23/2 5' - <u>cca</u> u <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 53
NK-0016	22/3 5' - <u>cau</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 2
NK-0038	21/4 5' - <u>au</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 54
NK-0026	20/5 5' - <u>uu</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 55
NK-0027	18/7 5' - <u>aga</u> u <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 56
NK-0028	16/9 5' - <u>aa</u> u <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 57
NK-0029	14/11 5' - <u>gua</u> u <u>gaa</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 58
NK-0014	12/13 5' - <u>au</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 14
NK-0030	9/16 5' - <u>aca</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 59
NK-0031	7/18 5' - <u>aaca</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 60
NK-0020	5/20 5' - <u>ca</u> gaa <u>aa</u> uu <u>aa</u> gaa <u>ca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 61
NK-0019	4/21 5' - <u>aga</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 7
NK-0018	3/22 5' - <u>gcca</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 62
NK-0039	2/23 5' - <u>cca</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 63
NK-0032	1/24 5' - <u>cca</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 64
NK-0040	1/25 5' - <u>cca</u> aa <u>uu</u> aa <u>gaca</u> aa <u>ca</u> cc <u>cc</u> acac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>u</u> g <u>uca</u> u <u>au</u> cu <u>cu</u> ca <u>u</u> g <u>gu</u> uu <u>uc</u> uc <u>cg</u> -3' 65

FIG. 21

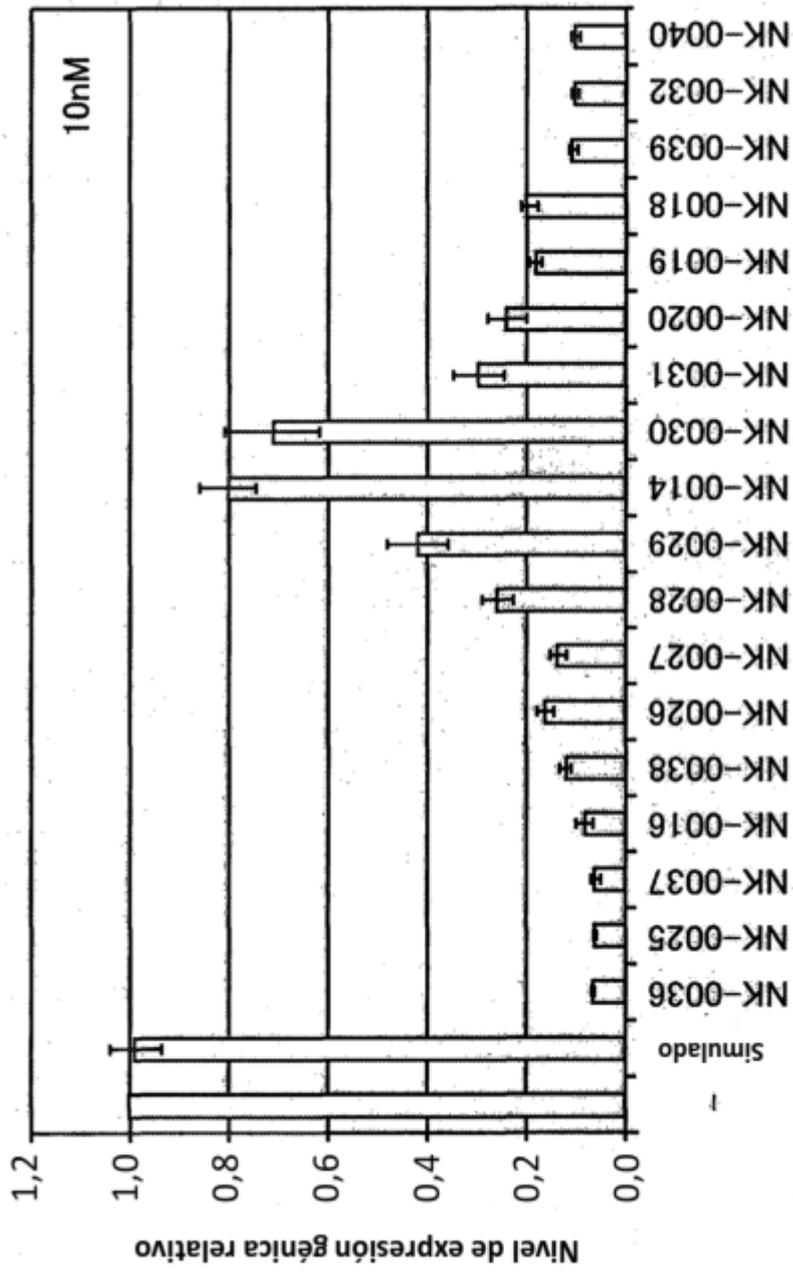


FIG. 22

Xc+Yc/X+Y

NK-0047 26/27 5' - aaccaugagaauaudacacacaccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGGc -3' 66

NK-0025 25/26 5' - accaugagaauaugacacacaccCCACACCGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGGg -3' 52

NK-0048 24/25 5' - accaugagaauaugacacacaccCCACACCGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGGg -3' 67

NK-0049 23/24 5' - ccaugagaauaudacacacaccCCACACCGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGGa -3' 68

NK-0050 23/24 5' - accaugagaauaugacacacaccCCACACCGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGGg -3' 69

NK-0051 22/23 5' - ccaugagaauaugacacacaccCCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGa -3' 70

NK-0052 21/22 5' - caugagaauaugacacacaccCCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGa -3' 71

NK-0053 21/22 5' - ccaugagaauaugacacacaccCCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGa -3' 72

NK-0054 20/21 5' - caugagaauaugacacacaccCCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCGUUCGa -3' 73

FIG. 23

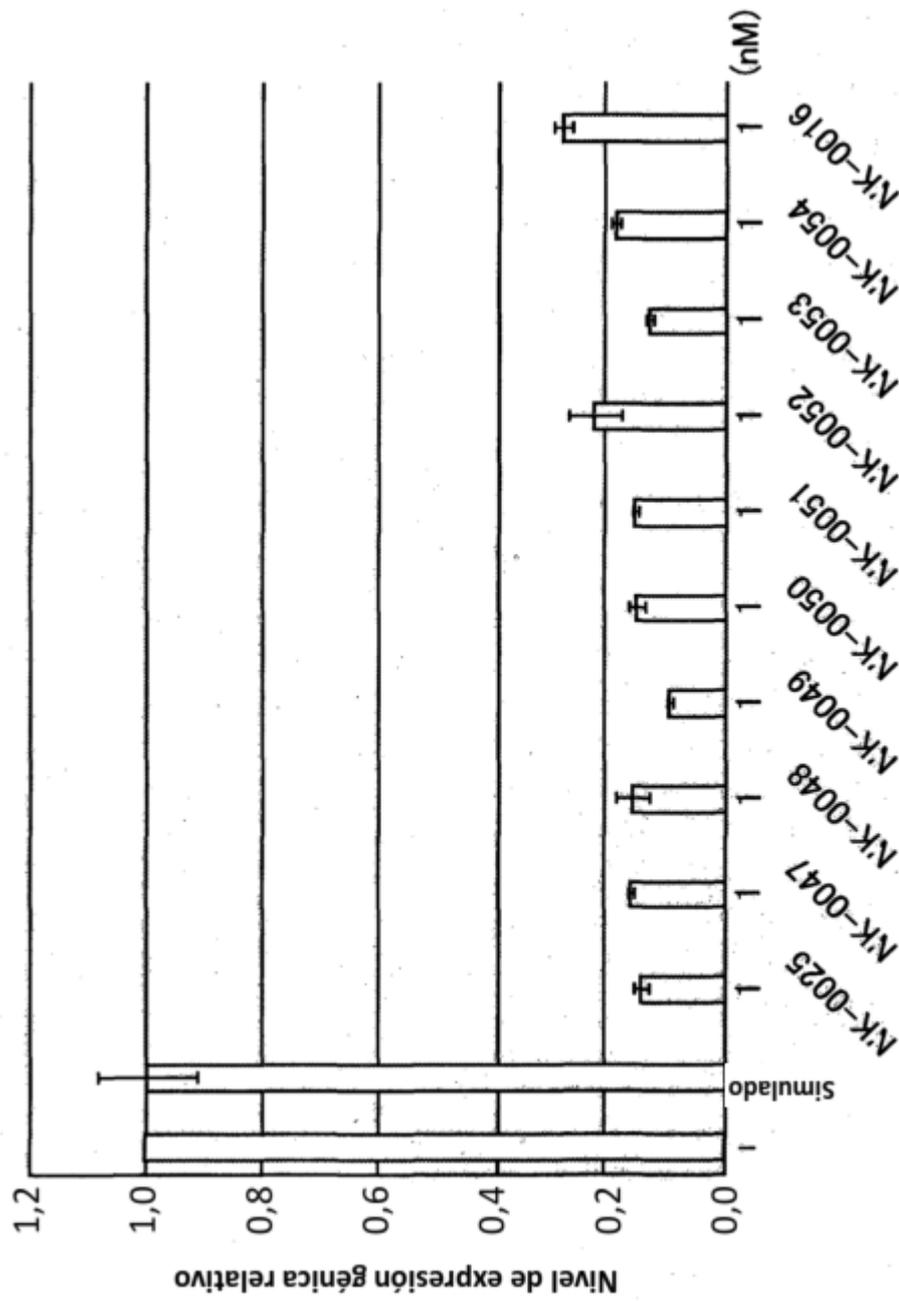


FIG. 24

Xc/X	
NK-0001	25/25 5' - <u>aacc</u> au <u>gaa</u> aa <u>ua</u> u <u>gaca</u> aa <u>ca</u> g <u>ccc</u> CCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUCUUCGg -3'
NK-0002	23/25 5' - <u>cca</u> u <u>gaa</u> aa <u>ua</u> u <u>gaca</u> aa <u>ca</u> g <u>ccc</u> CCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUC <sup>*</sup> UUCGg -3'
NK-0003	22/25 5' - <u>ca</u> u <u>gaa</u> aa <u>ua</u> u <u>gaca</u> aa <u>ca</u> g <u>ccc</u> CCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUC <sup>*</sup> UUCGg -3'

FIG. 25

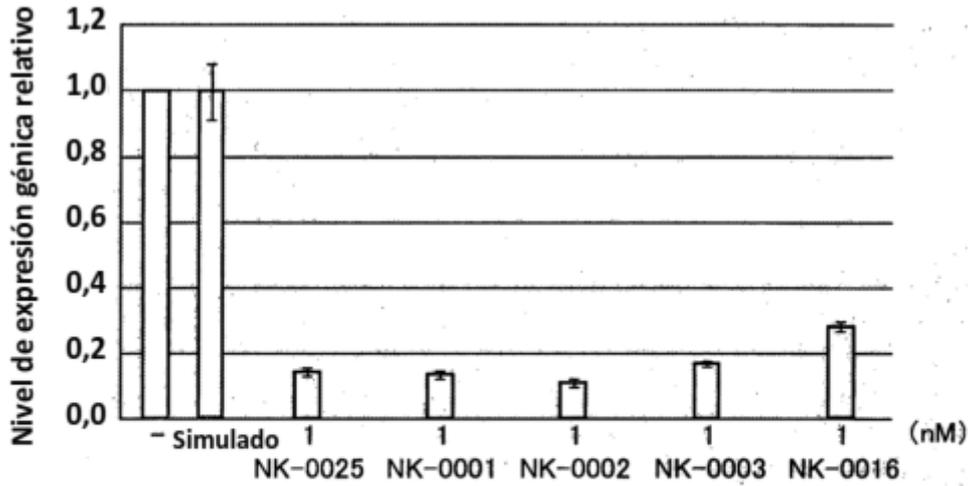
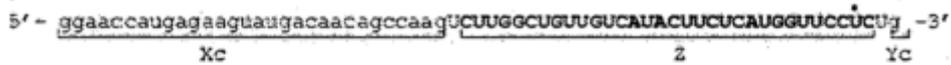


FIG. 26

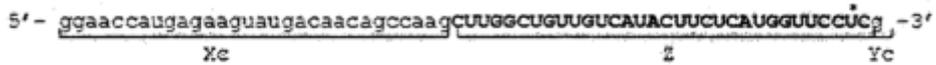
NK-0079 (SEQ ID NO: 77)  $L_x/L_y = 4/7$



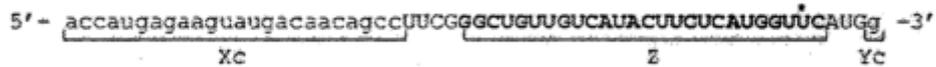
NK-0080 (SEQ ID NO: 78)  $L_x/L_y = 1/1$



NK-0081 (SEQ ID NO: 79)  $L_x/L_y = 0/0$



NK-0082 (SEQ ID NO: 8)  $L_x/L_y = 4/3$



NK-0083 (SEQ ID NO: 37)  $L_x/L_y = 9/3$



FIG. 27

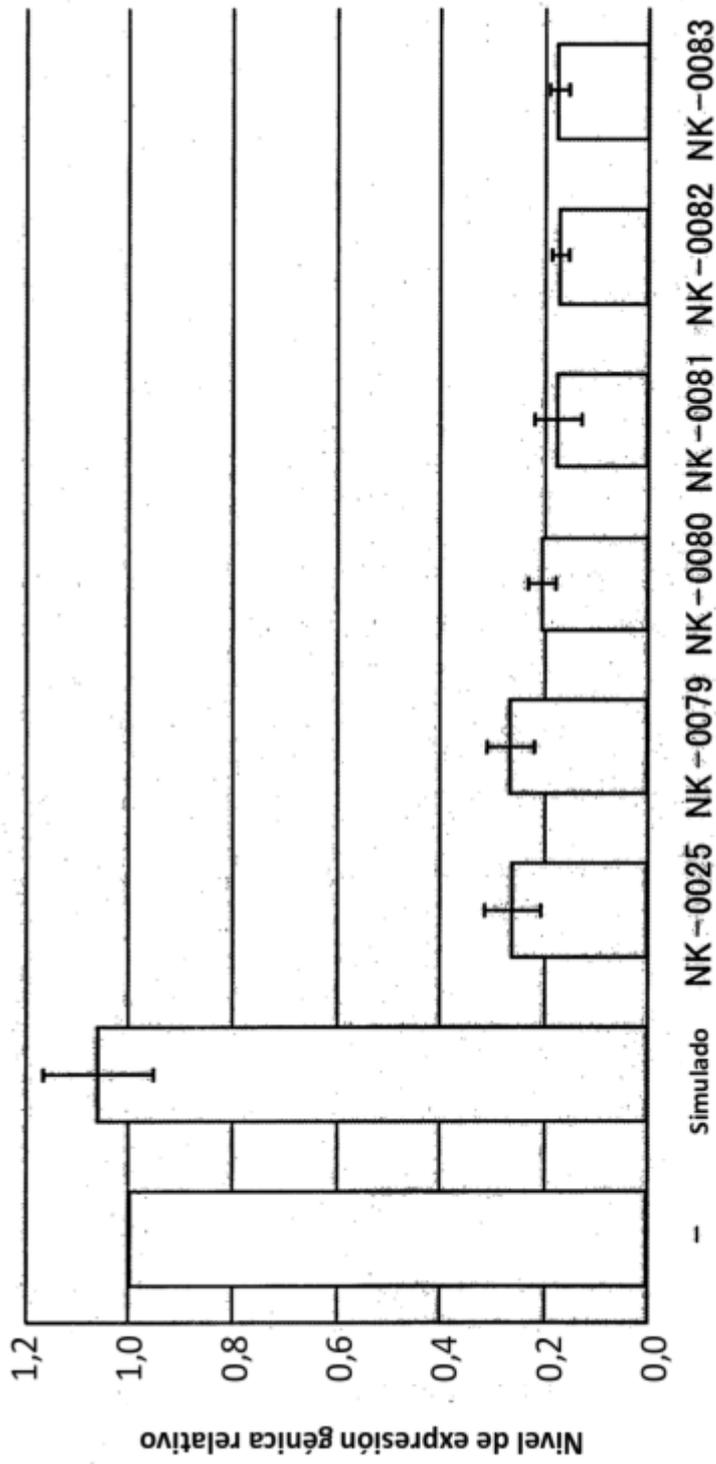


FIG. 28

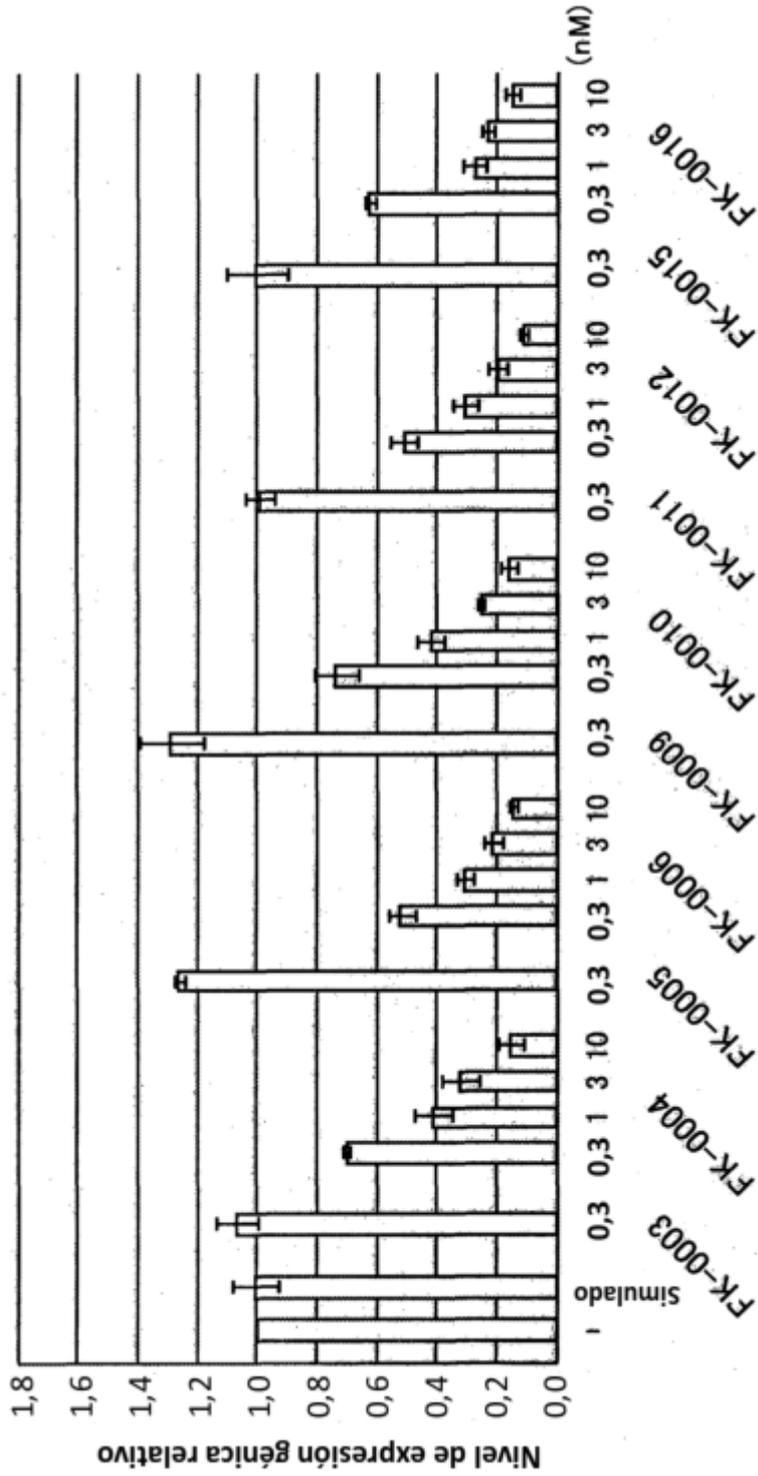


FIG. 29

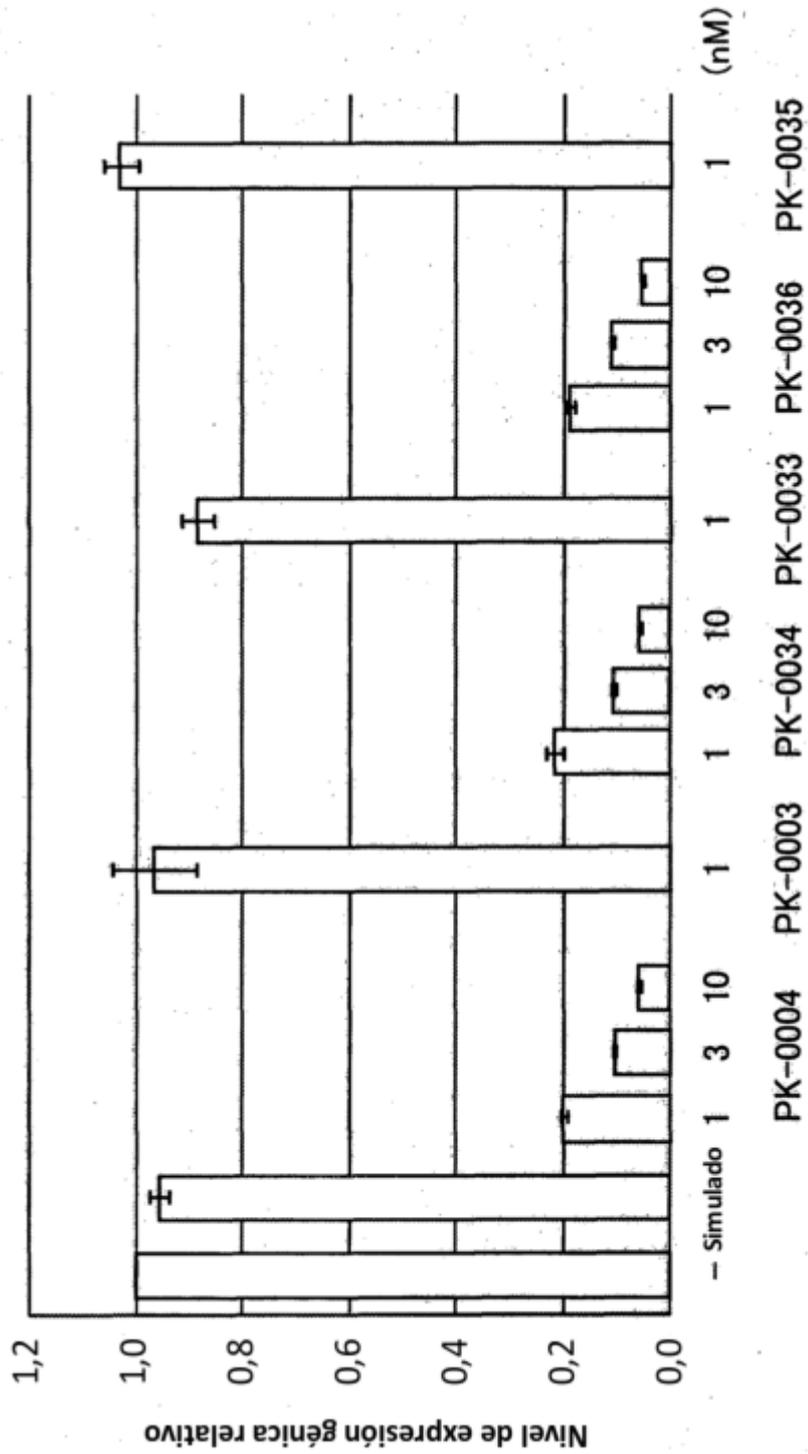


FIG. 30

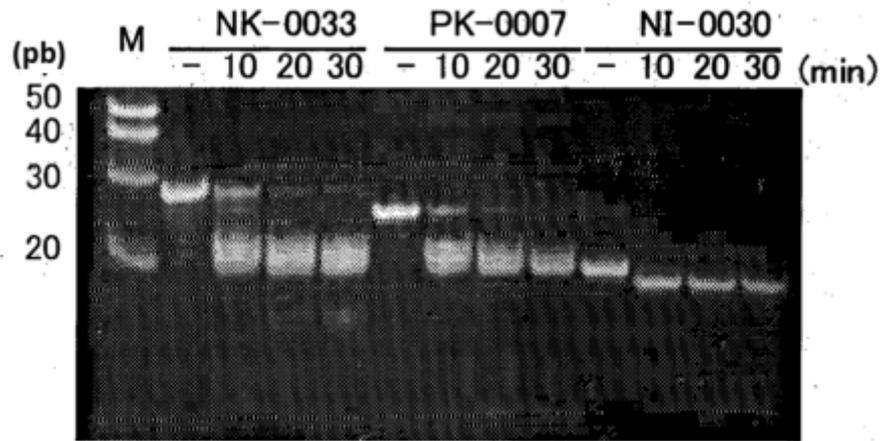


FIG. 31

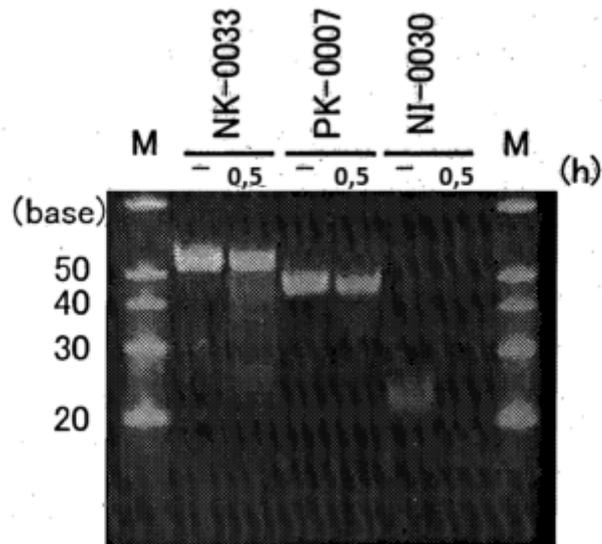


FIG. 32